

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXVI°

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET/05

TITOLO TESI

**Sorveglianza dell'infezione da virus dell'epatite E (HEV) in Italia:
from farm to table**

Presentata da: Giorgia Angeloni

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Fabio Ostanello

Correlatore

Dott. Franco M. Ruggeri

Correlatore

Dott. Ilaria Di Bartolo

Esame finale anno 2014

Sommario

PARTE GENERALE.....	1
1 Eziologia.....	4
1.1 Struttura virale e organizzazione del genoma.....	4
1.2 Tassonomia e Nomenclatura.....	6
2 Epidemiologia di HEV nell'uomo	10
2.1 Caratteristica dell'infezione da HEV nelle regioni con alta endemicità.....	10
2.2 Caratteristiche dell'infezione da HEV nelle regioni a bassa endemicità	11
2.3 Modalità di trasmissione nell'uomo.....	13
3 Epidemiologia di HEV nelle specie animali	15
3.1 HEV nel suino.....	15
3.2 HEV nei mammiferi selvatici: cinghiale, cervo e mangusta	18
3.3 Nuovi genotipi di HEV: topi, conigli, furetti e pipistrelli	19
3.4 Avian HEV	20
3.5 HEV nelle altre specie recettive.....	21
3.6 Modalità di trasmissione di HEV nel suino	22
4 Patogenesi dell'infezione nel suino	23
4.1 Sintomi e lesioni patologiche.....	24
5 Diagnosi	26
5.1 Diagnosi diretta	26
5.2 Diagnosi indiretta	28
PARTE SPERIMENTALE.....	29
6 Circolazione del virus dell'epatite E nei suini in diverse regioni d'Italia.....	31
6.1 Introduzione	31
6.2 Sorveglianza del virus dell'epatite E negli allevamenti suini dal 2011 al 2013.....	34
6.3 Studio epidemiologico retrospettivo in tre allevamenti del Nord Italia (anno 2000)	50

6.3.3 Risultati.....	51
7 Sequenziamento e caratterizzazione del genoma completo di un ceppo suino di HEV	54
7.1 Materiali e Metodi.....	54
7.2 Risultati	59
7.3 Discussione	65
8 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nella filiera di produzione del suino	68
8.1 Materiali e metodi	69
8.2 Risultati	73
8.3 Discussione e conclusioni	77
9 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nelle salsicce di fegato in Italia	79
9.1 Introduzione	79
9.2 Materiali e metodi	80
9.3 Risultati	82
9.4 Discussione	88
9.5 Conclusioni	89
10. Prove di replicazione in vitro del virus dell'epatite E	91
10.2 Materiali e Metodi.....	91
10.3 Risultati	93
10.4 Discussione	94
11 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nelle bili di animali al macello.....	95
11.1 Introduzione	95
11.2 Campionamento	95
11.3 Materiali e Metodi.....	95
11.4 Risultati e discussione.....	96
12 Conclusioni	97
13 Bibliografia.....	99

PARTE GENERALE

Introduzione

Il virus dell'Epatite E (HEV) è l'agente eziologico dell'Epatite E, una malattia infettiva di origine virale caratterizzata da epatite acuta, trasmesso principalmente per via oro fecale. (Meng, 2008; Purcell and Emerson, 2001). HEV è endemico in molti Paesi in via di sviluppo dell'Africa e dell'Asia dove causa focolai di epatite E generalmente legati al consumo di acqua o cibo contaminato e alle scadenti condizioni sanitarie (Arankalle et al., 1995; Chandra et al., 2008; Purcell and Emerson, 2001). I Paesi industrializzati, come Canada, Europa, Giappone e Stati Uniti erano ritenuti esenti da HEV, e i casi riportati erano generalmente limitati a soggetti con anamnesi di viaggio nelle aree in cui il virus era endemico. Nell'ultimo decennio, in questi Paesi, è stato riportato un numero sempre maggiore di casi sporadici di epatite E non legati a viaggi all'estero (Aggarwal and Jameel, 2011). Si è così iniziato ad ipotizzare l'esistenza di un serbatoio animale sul territorio. Nel 1997, per la prima volta, è stato identificato un ceppo di HEV nel suino, denominato SwHEV (Meng et al., 1997). L'analisi delle sequenze genetiche dei virus circolanti nel suino e di quelli umani ha dimostrato come le percentuali di identità nucleotidica dei ceppi circolanti nelle due specie siano elevate, raggiungendo in alcuni casi valori del 100% (de Deus et al. 2007; Huang et al. 2002). Pertanto molti lavori scientifici si sono incentrati sulle modalità di trasmissione zoonotica di HEV dal suino all'uomo. Si è così scoperto che questo virus può essere trasmesso attraverso il consumo di carne e fegato sia di suino che di cinghiale se consumati senza un adeguato trattamento termico (Matsuda et al. 2003; Tamada et al. 2004). Nel 2010 poi è stato dimostrato come HEV abbia causato un focolaio di epatite E in Corsica, dovuto al consumo di "figatellu", ovvero salsicce di fegato consumate senza cottura (Colson et al. 2010).

Con la presente tesi di dottorato si è voluto in primo luogo monitorare la presenza di HEV negli allevamenti suinicoli nel triennio 2011-2013, focalizzandosi sull'analisi delle sequenze dei ceppi suini ottenute, e ponendo particolare attenzione al confronto tra questi e gli altri ceppi suini e umani circolanti in Italia.

In secondo luogo si è ricercata la presenza di HEV lungo la filiera di produzione del suino, dal macello al punto di vendita, e in seguito nei prodotti carnei di origine suina. Alla luce dello studio caso-controllo sopra riportato (Colson et al. 2010), si è scelto inoltre di analizzare le salsicce di fegato, in quanto anche in alcune regioni italiane è presente l'abitudine di consumarle crude o poco cotte.

1 Eziologia

1.1 Struttura virale e organizzazione del genoma

Il virus dell'Epatite E è stato identificato per la prima volta, mediante microscopia elettronica, nel 1983 dalle feci di un paziente con epatite a trasmissione enterica non A-C (Balayan et al., 1983, Kane et al., 1984). HEV è un virus a ssRNA, di piccole dimensioni (27-34 nm) a simmetria icosaedrica, privo di envelope. Il genoma virale è lungo 7,2 kb e presenta un *cap* iniziale di 7-metilguanosina, seguito da tre *open reading frames* (ORFs) e da una seconda regione non codificante (UTR) di 65-74 nucleotidi con una coda di poli A all'estremità al 3'. Il gene *ORF1* codifica per proteine non strutturali implicate nella replicazione virale, la *ORF2* per la proteina del capside mentre il gene *ORF3* codifica per una proteina (Orf3) che sembra essere implicata nel rilascio del virione dalle cellule infettate (Okamoto et al., 2011) in quanto studi di sulla replicazione virale dimostrano che essa si trova sia associata al citoscheletro cellulare che sulla superficie del virus (Yamada et al., 2009). Malgrado questi studi la cui funzione di questa proteina non è ancora ben nota (Figura 1). Sebbene la conformazione del genoma rimanga conservata, la sua lunghezza può variare tra i ceppi nelle diverse specie animali: i genomi più corti sono stati identificati nei ratti in Vietnam (6.927 nt) (Li et al., 2013), negli uccelli (6.654 nt) (Huang et al., 2004) e recentemente nei pipistrelli (6.767 nt) (Drexler et al., 2012).

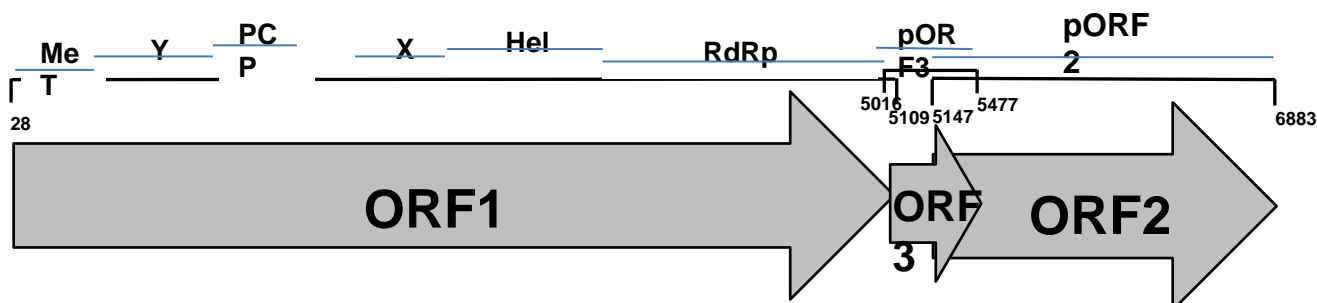


Figura 1.1: organizzazione del genoma di HEV. Sono indicati i nucleotidi di inizio e fine delle 3 ORFs rispetto ad un ceppo di riferimento (Acc. N. M73218). Sono indicati le proteine e i domini funzionali presenti nella *ORF1*: MeT: metiltransferasi, Y: dominio Y, PCP: Cisteina Proteasi Papaina-simile, X: dominio X, HEL: elicasi, RdRp: RNA-polimerasi-RNA-dipendente. Parzialmente modificata dal libro: "Hepatitis E Virus, An emerging zoonotic and foodborne pathogen" Ruggeri et al. 2013.

La *ORF1*, lunga 5079 nucleotidi, è situata all'estremità 5' del genoma virale e codifica per una poliproteina di 1693 amminoacidi, che subisce un clivaggio post-trascrizionale nelle seguenti proteine non strutturali (Figura 1.1):

- 1) Metiltrasferasi (MeT), catalizza le reazioni di *capping* sia del genoma che degli RNA virali sub genomici (Rozanov et al., 1992). Il *capping* degli RNA virali è importante per la loro traduzione, e recentemente è stato messo in evidenza che questa reazione protegge il virus dalla risposta immunitaria innata dell'ospite, interagendo con il meccanismo a cascata dell'interferone (Pichlmair et al., 2006).
- 2) Dominio Y, la cui funzione non è ben nota ma che mostra un'elevata omologia con proteine non strutturali di altri virus a RNA a singolo filamento positivo (Dryden et al., 2012).
- 3) Cisteina Proteasi Papaina-simile (PCP), enzima che sembra essere coinvolto nel processamento della poliproteina codificata dall'ORF1 al fine di ottenere le altre proteine non strutturali (Ahmad et al., 2011).
- 4) Dominio X, recentemente rinominato "macro dominio"; sembra essere coinvolto nel legame tra l'ADP-ribose e la sua forma polimerica (Neuvonen and Ahola, 2009).
- 5) Elicasi, la proteina agisce sulle molecole di RNA, DNA o sui duplex RNA-DNA durante i processi di replicazione, riparazione e trascrizione del genoma (Panda et al., 2007). Inoltre l'elicasi di HEV, grazie all'attività RNA 5'-trifosfatasi, prende parte al primo step di *capping* dell'RNA virale (Karpe and Lole, 2010).
- 6) RNA-polimerasi-RNA-dipendente (RdRp), enzima essenziale per la replicazione virale essendo necessario per la sintesi di un RNA anti-genomico intermedio (Rehman et al., 2008).

La *ORF1* è seguita dalla *ORF3*, una regione del genoma lunga (366-369 nucleotidi) che si sovrappone al 5' alla *ORF1* stessa mentre al 3' è sovrapposta alla *ORF2* (figura 1.1). Questa regione è conservata in tutti i ceppi di HEV, compresi quelli di origine aviaria e codifica per una piccola fosfoproteina (pOrf3) espressa a livello intracellulare. Questa proteina non mostra nessuna omologia con altre proteine virali note, e il suo ruolo rimane ancora dubbio. Recenti studi mostrano come essa potrebbe essere coinvolta nel rilascio dei virioni dalla superficie delle cellule infettate (Okamoto, 2011). Inoltre la pOrf3 diminuisce la risposta innata dell'ospite attraverso la riduzione dell'espressione delle proteine di fase acuta e una maggior secrezione di α 1-microglobuline (Panda et al., 2007).

La *ORF2*, lunga 1980 nucleotidi, codifica per la proteina del capsido virale (pOrf2). Essa è una glicoproteina strutturale di 599-660 amminoacidi (aa) (Okamoto, 2008). La pOrf2 viene inizialmente sintetizzata come precursore che in seguito è clivato in una proteina matura e glicosilata in tre siti (fenomeno frequente nelle proteine dell'*envelope* ma raro per una proteina capsidica). Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la proteina è espressa sia a livello intracellulare sia sulla superficie cellulare (Krawczynski, 1993; Panda et al., 2007). La regione *ORF2* contiene 3 domini lineari: il

dominio S (aa: 119-319), responsabile della formazione del capsido, e i domini M (aa: 320-454) e P (aa: 320-606), importanti durante l'interazione virus cellula ospite. Il dominio M si suppone intervenga nella fase di riconoscimento del recettore cellulare; mentre il dominio P rimane esposto all'esterno del capsido ed è un possibile sito di legame per gli anticorpi (Ahmad et al., 2011). Recentemente, nei ceppi circolanti nei topi e nei pipistrelli, sono state descritte ulteriori *ORFs* ma la loro funzione rimane ancora sconosciuta e sembrano non appartenere a nessuno dei domini presenti conosciuti (Johne et al., 2010, Drexler et al., 2012).

1.2 Tassonomia e Nomenclatura

Dal 2004 HEV è classificato nel genere *Hepevirus*, appartenente alla famiglia delle *Hepeviridae* (Emerson and Purcell, 2003). Ad oggi sono stati identificati 4 principali genotipi di HEV (Lu et al., 2006; Schlauder e Mushahwar, 2001). I genotipi 1 e 2 sono responsabili della maggior parte dei focolai epidemici di HEV nell'uomo rispettivamente nel continente asiatico, e in Messico e in alcuni Stati africani (Nigeria and Chad); essi causano epidemie generalmente legate al consumo di acqua contaminata. I genotipi 3 e 4, che presentano un 74-75% di identità nucleotidica con i genotipi 1 e 2 (Meng et al., 1997), infettano sia l'uomo che gli animali, tra cui il suino (che risulta essere il principale serbatoio), il cinghiale, il cervo, il coniglio (Goens e Perdue, 2004; Meng et al., 2012 Okamoto, 2008; Panda et al., 2007). Nei paesi industrializzati il genotipo 3 è stato in un primo tempo associato esclusivamente a malattia in soggetti di ritorno da paesi endemici, mentre oggi è associato di frequente a casi autoctoni senza anamnesi di viaggi all'estero. Il genotipo 4, era considerato esclusivamente asiatico, tuttavia di recente ceppi appartenenti a questo genotipo sono stati identificati anche in Europa, sia nell'uomo sia nel suino (Meng, 2011 Emerson and Purcell, 2003, Okamoto, 2007, Kamar et al., 2012, Scobie and Dalton, 2013) (Figura 1.2). Negli Stati Uniti, nel 2001, è stato scoperto un altro genotipo di HEV circolante nelle specie aviare e denominato pertanto *avian* HEV. Sebbene questo genotipo mostri solo un 50-60% di identità nucleotidica con i ceppi circolanti nei mammiferi (Haqshenas et al., 2001). Gli uccelli non sono suscettibili all'infezione con i ceppi umani e ceppi di HEV aviari non sono mai stati associati a casi di infezione nell'uomo (Kamar et al., 2012), limitandosi ad infettare le specie avicole dove è responsabile della Sindrome dell'Epato-Splenomegalia del pollo (Haqshenas et al., 2001).

Recentemente, nel ratto (Johne et al., 2010), nel furetto (Raj et al., 2012), nel cinghiale (Takahashi et al., 2011), nel pipistrello (Drexler et al., 2012) e nella trota (*Oncorhynchus clarkii*) (Batts et al., 2011), sono stati identificati nuovi genotipi di HEV distanti rispetto a quelli presenti nei mammiferi. E' stato proposto di introdurre due distinti *clades*, uno che comprenda i ceppi umani e quelli animali strettamente correlati ad essi, e un altro che comprenda i ceppi circolanti delle restanti specie, ovvero di chiroterti, roditori e specie avicole (Drexler et al., 2012). Per quanto riguarda il virus identificato nella trota, questo risulta geneticamente molto distante da tutti gli altri genotipi animali e pertanto dovrebbe formare un unità tassonomica distinta. Queste evidenze suggeriscono

che la classificazione dei genotipi all'interno della famiglia delle Hepeviridae dovrà essere rivista.

Con il recente aumento di sequenze disponibili, nel 2006, Lu et al. hanno proposto un'ulteriore suddivisione dei 4 genotipi in sottotipi, basandosi sulle sequenze dei 300-450 nucleotidi terminali della regione genomica dell'ORF2, essendo questa la più conservata in tutti i ceppi di HEV sequenziati. Secondo questo studio, il genotipo 1 si può suddividere in 5 sottotipi (1a, 1b, 1c, 1d e 1e), il genotipo 2 in 2 sottotipi (2a e 2b), il 3 in 10 sottotipi (dal 3a al 3j), e il 4 in 7 (dal 4a al 4g), per un totale di 24 sottotipi (Lu et al., 2006) (Figura 1.3). La maggior diversità dei genotipi 3 e 4 appare legata alla loro presenza, oltre che nell'uomo, anche in diverse specie animali in distinte regioni geografiche. Per lo stesso motivo, è stata riscontrata una minor variabilità dei genotipi 1 e 2: infatti questi sono stati identificati solo raramente in specie diverse dall'uomo (Pavio et al. 2010). Infine, diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di quasispecie intra-ospite sia negli animali sia nell'uomo. Durante uno studio, Grandadam et al. (2004), gli Autori hanno riscontrato delle differenze nucleotidiche sia intra-paziente che inter-paziente nei ceppi identificati in campioni di siero prelevati in corso di un focolaio di epatite E in Algeria negli anni 1986-1987. La stessa cosa è stata dimostrata da un recente studio condotto nel suino (Bouquet et al 2012). Inoltre un recente studio condotto utilizzando tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) conferma l'esistenza di quasispecie intra-ospite in suini infettanti sperimentalmente, e afferma che il range delle quasispecie riscontrate per SwHEV è minore rispetto ad altri virus umani, come ad esempio l'HIV, ma comunque in linea con altri virus zoonotici (Bouquet et al 2012).

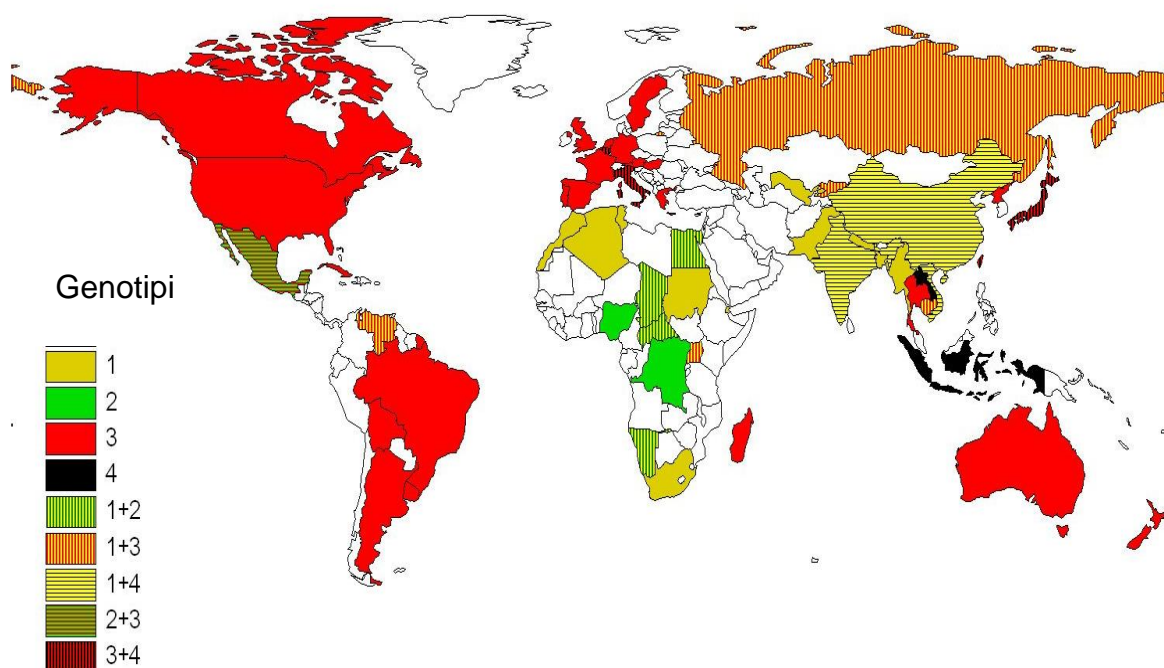


Figura 1.2: Distribuzione dei diversi genotipi di HEV nel mondo. I colori utilizzati evidenziano la predominanza dei vari genotipi umani e animali (principalmente di origine suina). Parzialmente modificata dal libro: “Hepatitis E Virus, An emerging zoonotic and foodborne pathogen” Ruggeri et al. 2013.

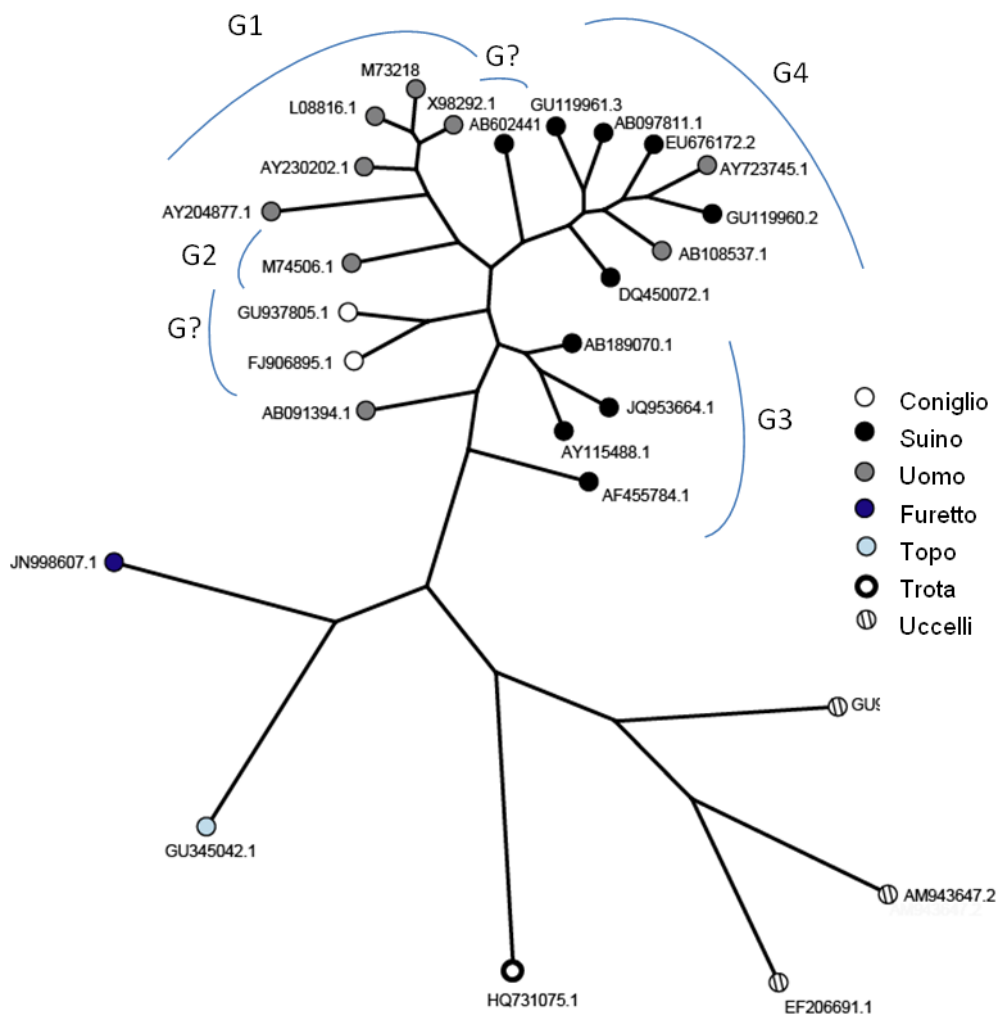


Figure 1.3: L'albero filogenetico mostra i diversi genotipi di HEV identificati fino ad oggi. L'albero è stato costruito utilizzando delle sequenze del genoma di HEV di origine umana o animale disponibili in NCBI. La figura riporta gli accession number dei ceppi utilizzati. Parzialmente modificata dal libro: "Hepatitis E Virus, An emerging zoonotic and foodborne pathogen" Ruggeri et al. 2013.

2 Epidemiologia di HEV nell'uomo

I pattern epidemiologici di infezione da HEV nell'uomo possono essere essenzialmente distinti a seconda delle diverse aree geografiche e alla prevalenza della malattia. La via di trasmissione, i gruppi di popolazione coinvolti e i diversi quadri clinici, differiscono nelle aree con alta o bassa endemicità di HEV, così come descritto di seguito (Figura 2.1).

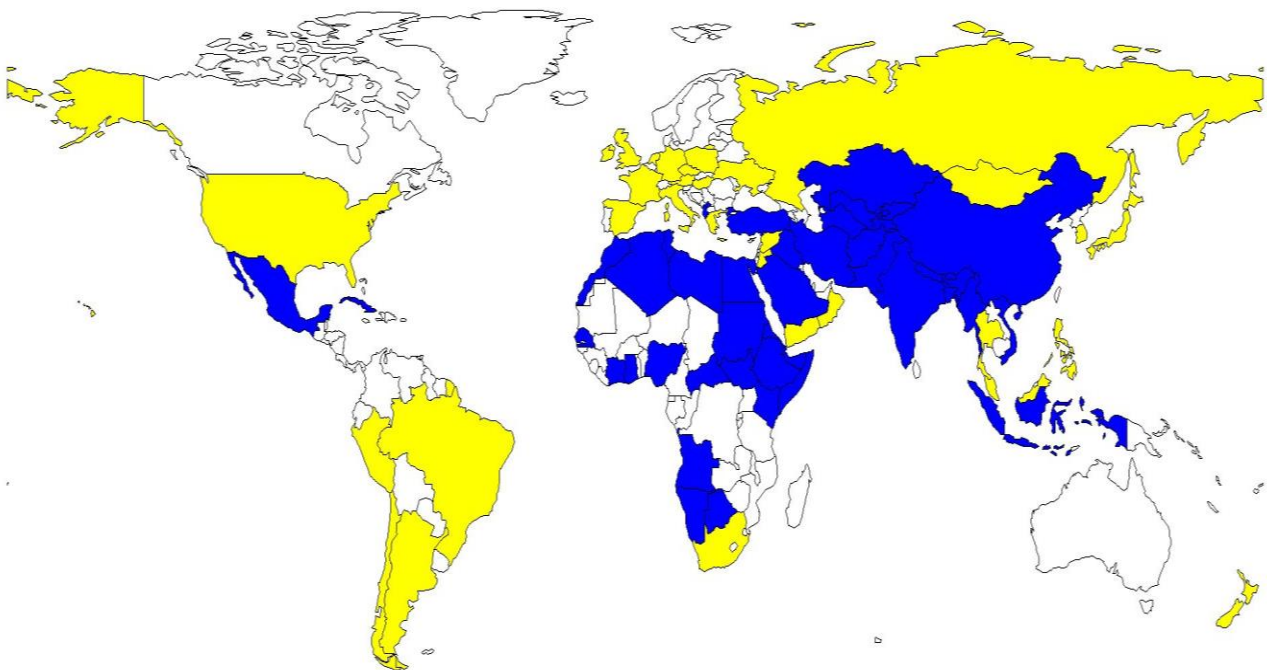


Figura 2.1: Distribuzione di HEV a livello mondiale. In blu sono evidenziati i Paesi ad alta endemicità, in cui i focolai attribuiti ad HEV sono $\geq 25\%$ delle epatiti non A-nonB, in giallo quelli a bassa endemicità, ovvero in cui i casi umani riferibili ad HEV sono $< 25\%$ delle epatiti non A-nonB. Le zone in bianco sono quelle in cui HEV non è endemico o in cui non sono stati effettuati degli studi. Parzialmente modificata dal libro: "Hepatitis E Virus, An emerging zoonotic and foodborne pathogen" Ruggeri et al. 2013.

2.1 Caratteristica dell'infezione da HEV nelle regioni con alta endemicità

Il virus dell'epatite E è ampiamente diffuso nei Paesi tropicali e sub-tropicali in via di sviluppo, con sieroprevalenze che variano a seconda delle fasce di età, dal 5% nei bambini di età inferiore ai 10 anni al 10-40% negli adulti oltre i 25 anni (Emerson e Purcell, 2003). Nelle regioni iperendemiche questi valori possono raggiungere anche l'80% (Fix et al., 2000). Le regioni in cui HEV è più diffuso sono il subcontinente indiano, la Cina, l'Asia Sud-Orientale e Centrale, il Medio Oriente, il nord e

est Africa e l'America centro-meridionale. (Emerson e Purcell, 2003). In questi Paesi i genotipi 1 e 2 di HEV provocano focolai di vaste dimensioni coinvolgendo anche migliaia di persone, soprattutto in Cina, India, Somalia e Uganda (Bile et al. 1994, Naik et al., 1992; Teshale et al. 2010, Zhuang et al., 1991).

Nella maggior parte di questi focolai l'infezione da HEV è di origine oro-fecale, mediante il consumo di acqua contaminata. La loro durata può variare da poche settimane a più di un anno; questi ultimi casi si verificano in seguito alla persistente contaminazione della rete idrica, dei laghi o dei fiumi (Kamar et al. 2012). In particolar modo, i focolai di HEV più estesi sono avvenuti in seguito ad alluvioni che hanno portato ad un collasso della rete fognaria con conseguente contaminazione degli acquedotti. In altri casi le epidemie di epatite E si sono presentate in periodi di siccità in seguito a una diminuzione del livello dei corsi d'acqua con conseguente concentrazione delle contaminazioni fecali.

Le epidemie si possono verificare anche senza coinvolgimento delle reti idriche, ma in presenza di condizioni igienico-sanitarie scarse; inoltre, sebbene implicate in un numero minore di casi, sono segnalati casi trasmissione alimentare e trasfusionale (Aggarwal and Jameel 2011). Sembra invece poco comune la trasmissione diretta uomo-uomo.

Mediamente il tasso di attacco durante i focolai di epatite E varia dall'1 al 15% (Aggarwal and Jameel, 2011). Questo tasso raggiunge valori massimi nei giovani adulti di sesso maschile (3-30%), anche se la motivazione non è ancora chiara: i tassi di attacco più bassi si registrano invece nei bambini (Aggarwall et al., 2009). Inoltre gli uomini presentano forme clinicamente manifeste di HEV più frequentemente rispetto alle donne (fino a 5 volte). Il tasso di attacco secondario di HEV è generalmente molto basso se paragonato ad altri virus a trasmissione oro-fecale (come ad es. l'Epatite A) e i valori oscillano tra lo 0,7% e il 2,2%. Questo potrebbe essere dovuto a differenze legate alla dose infettante, all'eliminazione virale o alla resistenza del virus nell'ambiente (Aggarwall et al., 2000; Emerson and Purcell, 2003).

Il tasso di letalità correlato all'infezione da HEV si aggira, nei focolai epidemici, intorno allo 0,2-4% anche se raggiunge picchi del 10-25% nelle donne in gravidanza (Boccia et al. 2006). Questa differenza sembra legata a fattori ormonali o immunologici. Recentemente (gennaio 2014, <http://www.promedmail.org>) in un focolaio registrato in Uganda 13/334 persone infettate da HEV sono decedute; di queste 10 erano donne in stato di gravidanza (raggiungendo un tasso di letalità del 76,9%).

2.2 Caratteristiche dell'infezione da HEV nelle regioni a bassa endemicità

Ad oggi, HEV può essere considerato endemico anche in molti Paesi industrializzati. Infatti, in Europa, USA e nei Paesi sviluppati dell'area asiatica e pacifica (Giappone, Taiwan, Hong Kong, Austra-

lia), sono segnalati sempre più spesso casi sporadici di malattia in soggetti senza anamnesi di viaggio all'estero (Banks et al., 2004; Buti et al., 2004; Clemente-Casares et al., 2003; Dalton et al., 2007; Ijaz et al., 2005; Meng et al., 1997; Panda et al., 2007; Tahan et al., 2003; Teo, 2006; Zanetti et al., 1999; Aggarwal et al., 2011). I ceppi isolati in tali episodi sono risultati geneticamente differenti rispetto a quelli isolati nei Paesi in via di sviluppo, facendo supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a casi autoctoni correlati con i genotipi di HEV endemici sul territorio e non a infezioni contratte durante il soggiorno in Paesi a rischio (Acharya e Panda, 2006; Banks et al., 2007; Emerson and Purcell, 2003; Hsieh et al., 1999; Nishizawa et al., 2003; Zanetti et al., 1999). Casi autoctoni sono stati praticamente messi in evidenza in tutti i Paesi in cui HEV è stato ricercato ad eccezione della Finlandia (Kantala et al., 2009).

Numerosi studi sieroepidemiologici hanno inoltre rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV (5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, facendo ipotizzare un'elevata diffusione dell'infezione, seppur in genere a livello subclinico (Banks et al., 2004; Meng et al., 2002; Pei e Yoo, 2002; Schlauder et al., 1999; Takahashi et al., 2003; Zanetti e Dawson, 1994). Infatti, il limitato numero di casi di HEV riportati a fronte delle elevate siero prevalenze fa supporre che la maggior parte delle infezioni decorrano in maniera asintomatica. I genotipi maggiormente identificati in queste aree sono l'1, il 3 e il 4. Il primo è associato a malattia nei viaggiatori in aree endemiche. I genotipi 3 e 4 sono legati a casi sporadici di epatite E o di piccoli focolai, con sintomatologie variabili, da forme asintomatiche fino a casi di epatite acuta fulminante. Inoltre quest'ultimi due genotipi non causano elevati tassi di mortalità nelle donne gravide.

In Italia, HEV è responsabile del 5-10% delle epatiti acute virali non-A-C (Zanetti et al., 1994), che può essere quantizzato in poche centinaia di casi all'anno. Un recente studio (Romanò et al., 2011) ha attribuito ad HEV l'eziologia del 20,6% (134/651) casi di delle epatiti non-A-C in soggetti ospedalizzati nel nostro Paese tra il 1994 e il 2009. Di questi il 16,4% dei erano casi autoctoni, non legati a viaggi in Asia o Africa. L'analisi di alcune delle sequenze ottenute in questo studio ha mostrato come tutti i ceppi autoctoni sequenziati appartenessero al genotipo 3. Studi condotti in altri stati europei hanno rilevato la stessa situazione (Kamar et al. 2012).

Nel 2011 è stato identificato per la prima volta in Europa il genotipo 4 di HEV. La situazione epidemiologica di questo genotipo risulta essere molto interessante in quanto nello stesso anno g4 è stato segnalato sia nei suini in Belgio ed Olanda (Hakze-van der Honing et al., 2011), che in Francia in casi autoctoni nell'uomo (Jebblaoui et al., 2013). Inoltre, l'analisi delle sequenze ha mostrato come i ceppi umani francesi fossero molto simili a quelli suini identificati in Belgio. In seguito sono stati riportati in Francia altri casi autoctoni legati al g4 ma solo un caso è risultato correlato ai ceppi suini belgi. Anche in Italia sono stati identificati casi umani dovuti al g4 (Garbuglia et al., 2014) ma le sequenze ottenute mostravano solo un 74-85% di identità nucleotidica con i ceppi francesi (Bouamra et al., 2014). Questa evidenza suggerisce una probabile fonte di infezione sul territorio italiano. Ad oggi però ancora nessun genotipo 4 è stato identificato nel suino nel nostro Paese.

2.3 Modalità di trasmissione nell'uomo

Le modalità con cui HEV infetta l'uomo non sono ancora del tutto chiare, tuttavia si riconoscono almeno 5 vie di trasmissione (Figura 2.2).

1) Trasmissione oro-fecale legata a contaminazione delle acque, tipica dei Paesi in via di sviluppo e spesso responsabile di vasti focolai. Malgrado la mancanza di studi specifici atti a dimostrare la decadenza dell'infettività di HEV nell'ambiente, da diversi studi epidemiologici si può evincere come HEV possa facilmente resistere nell'ambiente e nelle acque.

2) Trasmissione di origine alimentare dovuta all'ingestione di alimenti infetti. Esistono alcuni casi in cui risulta evidente il link epidemiologico tra il caso clinico nell'uomo e il consumo di alimenti di origine suina. Il primo caso fu quello riportato da Yazaki et al. nel 2003 in Giappone, in cui 10 persone mostrarono sintomi di epatite acuta fulminante 2-8 settimane dopo il consumo di fegato di suino grigliato o poco cotto. In seguito altri studi confermarono l'associazione tra consumo di organi di suino, cinghiale e cervo grigliati o consumanti senza un'adeguata cottura, sia in Giappone (Matsuda et al., 2003, Takahashi et al., 2004, Li et al., 2005b, Masuda et al., 2005), che in altri stati (Gessoni and Manoni, 1996, Dalton et al., 2007, Colson et al., 2010, Widen et al., 2011, Bouquet et al., 2012b). L'uomo può inoltre infettarsi anche in seguito al consumo di vegetali irrigati con acqua contaminata da feci suine e umane, come dimostrato da un recente studio in cui HEV è stato riscontrato nel 3,4% dei vegetali a foglia verde analizzati (Kokkinos et al., 2012). Infine anche il consumo di molluschi bivalvi è stato associato all'infezione (Cacopardo et al., 1997, Scotto et al., 2013).

3) Trasmissione zoonotica, da animale a uomo, mediante esposizione a secreti provenienti da animali infetti. Questa modalità di trasmissione coinvolge maggiormente alcune categorie professionali come gli allevatori, i veterinari e i macellai, considerate pertanto categorie a rischio. Studi condotti in diversi Paesi dimostrano come essi presentino titoli anticorpali anti-HEV più elevati rispetto alla popolazione di controllo. Ad esempio, negli Stati Uniti anticorpi verso il virus dell'epatite E sono stati riscontrati nel 26% dei veterinari rispetto al 18% dei donatori di sangue (Meng et al., 2002). Un recente studio condotto in Germania ha dimostrato che anche le guardie forestali presentano un titolo anticorpale significativamente più alto nei confronti del genotipo 3 di HEV, rispetto alla popolazione di controllo; essi infatti durante la loro attività di campo possono venire in contatto con il virus eliminato dagli animali selvatici (Dremsek et al., 2012). Infine è stata riportata la trasmissione di SwHEV da un maialino vietnamita da compagnia a un paziente francese (Renou et al., 2008).

4) Trasfusioni di sangue infetto e trapianto di organi (Thomas et al., 1997, Khuroo et al., 2004, Boxall et al., 2006, Colson et al., 2007, Razonable, 2011a, Razonable et al., 2011b, Halac et al., 2012). La prima è stata descritta in pochi casi mentre il trapianto d'organi è ormai considerato un problema emergente. Infatti, molti casi di cronicizzazione della malattia sono stati descritti in

soggetti con trapianto d'organo e legati ad infezione con genotipi "zoonotici" 3 (Abranavel et al., 2014).

5) Trasmissione verticale (materno-fetale), riportata frequentemente nei Paesi ad alta endemicità (Khuroo et al., 2009, Aggarwal, 2011).

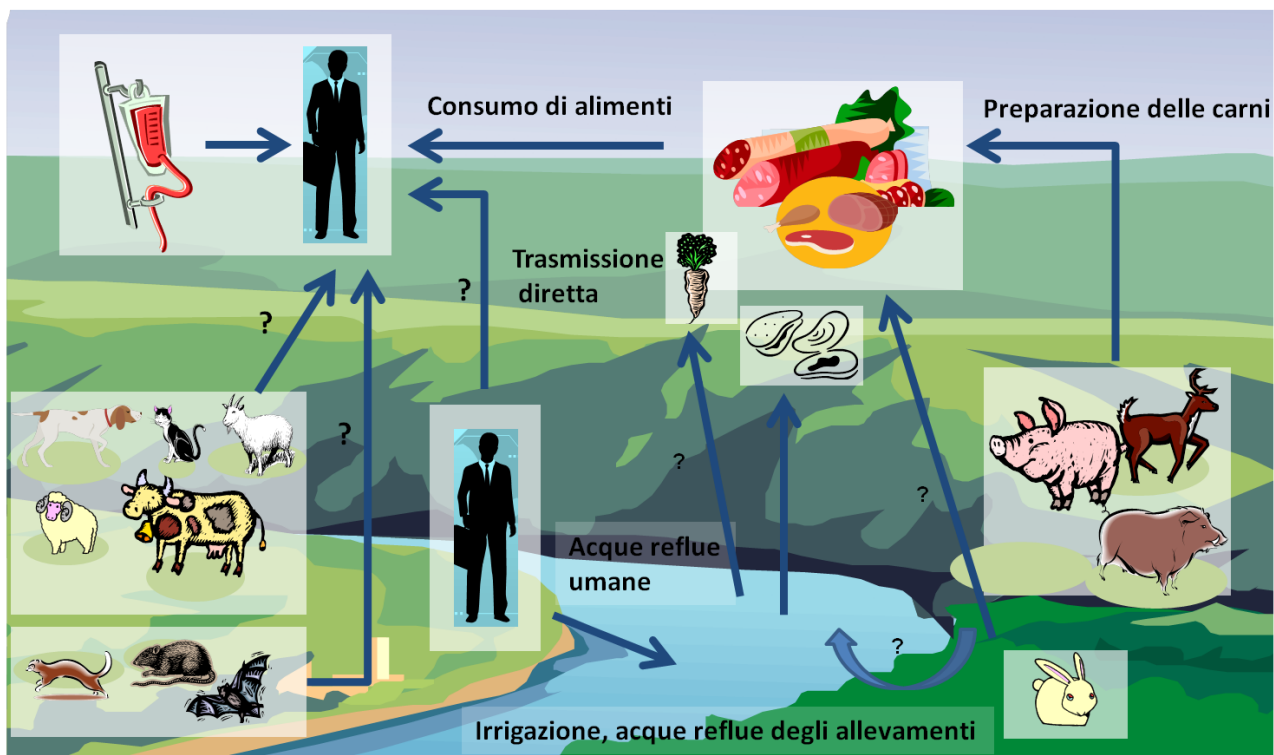


Figura 2.2: modalità di trasmissione di HEV. Indicate con i punti interrogativi) devo ancora essere confermate. Per quanto riguarda i genotipi 1 e 2, nella figura non sono rappresentate le trasmissione interumane, compresa quella verticale. Parzialmente modificata dal libro: "Hepatitis E Virus, An emerging zoonotic and foodborne pathogen" Ruggeri et al. 2013.

3 Epidemiologia di HEV nelle specie animali

La presenza diretta del virus o la messa in evidenza di anticorpi anti-HEV nel siero è stata riscontrata in molte specie animali (Goens e Perdue, 2004).

La presenza di anticorpi anti-HEV è stata documentata in suini, cinghiali, scimmie, manguste, cavie, topi, cervi, anatre, polli, cani, gatti, vacche, pecore, capre, cavalli, uccelli, bufali (Arankalle et al., 2001; de Deus et al., 2008a; Favorov et al., 2000; Goens e Perdue, 2004; Haqshenas et al., 2001; He et al., 2006; Kuno et al., 2003; Meng et al., 1997; Michitaka et al., 2007; Nakamura et al., 2006; Saad et al., 2007; Shukla et al., 2007; Vitral et al., 2005; Yu et al., 2007; Geng et al., 2010).

Al contrario l'RNA di HEV è stato documentato in un numero ridotto di specie, rispetto a quelle in cui sono stati rilevati gli anticorpi. Il primo ceppo virale animale è stato identificato nel suino (*swHEV*) (Meng et al., 1997), ma successivamente HEV è stato identificato in altre specie e in particolare in cinghiali (Sonoda et al., 2004), cervi (Tei et al., 2003), conigli (Zhao et al., 2009), manguste (Nakamura et al., 2006), cavalli (Saad et al., 2007), ostriche (Song et al., 2010), bovini (Hu et al., 2010), pecore (Wang et al., 2010) e ratti grigi (*Rattus norvegicus*) (Kanai et al., 2012), pipistrelli (Drexler et al., 2012), furetti (Raj et al. 2012) e alce (Li et al., 2013). I ceppi virali di HEV riscontrati in queste specie sono quasi tutti riconducibili ai genotipi 3 e 4; fanno eccezione i ceppi identificati nei ratti, nei pipistrelli e nell'alce e nei furetti la cui classificazione risulta ancora incerta.

3.1 HEV nel suino

Nel 1997, negli Stati Uniti è stato identificato e caratterizzato (Meng et al., 1997) il primo ceppo animale di HEV (*SwHEV*) nel suino. Analisi filogenetiche hanno rilevato che il virus si presentava strettamente correlato con i ceppi circolanti nell'uomo nello stesso territorio, seppur distinto da esso. In seguito alla sua scoperta, *SwHEV* è stato identificato in suini provenienti da tutto il mondo (Banks et al., 2004; Caprioli et al., 2007; Jung et al., 2007; Ning et al., 2008; Nishizawa et al., 2003; Preiss et al., 2006; Schlauder et al., 1999; Seminati et al., 2008; van der Poel et al., 2001; Vasickova et al., 2009; Zheng et al., 2006); i ceppi identificati nei suini si sono rivelati molto simili a quelli circolanti nell'uomo. Nei Paesi industrializzati, questi ceppi sono stati frequentemente correlati a casi autoctoni di malattia nell'uomo (Haqshenas et al., 2001, Engle et al., 2002, Meng et al., 2002, Choi et al., 2003, Nishizawa et al., 2003, Takahashi et al., 2003, Banks et al., 2004c).

Nei suini sono stati identificati solo i genotipi 3 e 4 di HEV, tranne in un caso in cui da un suino in Cambogia è stato isolato un genotipo 1-like (Caron et al., 2006).

Anticorpi anti-HEV sono stati rilevati in molti paesi; e variano a seconda della regione geografica e dell'età degli animali. Valori molto bassi o nulli sono stati rilevati nei suini fino a due mesi di vita, mentre dai 3-4 mesi di età è possibile riscontrare anticorpi specifici per il virus. Negli animali adulti

i tassi arrivano all' 80% (Clayson et al., 1995, Meng et al., 1997, Chandler et al., 1999, Hsieh et al., 1999, Pina et al., 2000, Garkavenko et al., 2001, van der Poel et al., 2001, Yoo et al., 2001, Meng et al., 2002, Pei and Yoo, 2002, Choi et al., 2003, Clemente-Casares et al., 2003, Takahashi et al., 2003, Banks et al., 2004a, Wang and Zhuang, 2004).

Per quanto riguarda la presenza dell'RNA virale, questo è stato riscontrato in tutte le categorie produttive, anche se gli animali nella fase di magronaggio risultano essere quelli in cui HEV è stato messo in evidenza più frequentemente, con valori che arrivano al 50% degli animali campionati (Banks et al., 2004; Di Bartolo et al., 2008; Fernandez-Barredo et al., 2006; Kase et al., 2009; Leblanc et al., 2007; Rutjies et al., 2007).

3.1.1 Presenza di HEV nei suidi in Italia

Per quanto riguarda il nostro Paese, la presenza di HEV è stata ben documentata nei suini (vedi tabella 3.1) e nei cinghiali. In uno studio condotto nel Nord Italia, sono stati prelevati campioni di feci da 274 suini scelti casualmente in sei diversi allevamenti. L' RNA di HEV è stato messo in evidenza in 115 dei campioni prelevati (42%). Tutti gli allevamenti sono risultati positivi all'infezione con prevalenze variabili tra il 12,8% e il 72,5%. Soggetti HEV-positivi sono stati riscontrati in tutte le fasce di età e in tutte le fasi produttive indagate, sebbene le prevalenze fossero maggiori negli animali in svezzamento piuttosto che in quelli all'ingrasso (42,2% vs 27,0%). Dal sequenziamento e dall'analisi filogenetica di 16 campioni PCR-positivi è risultato che gli isolati appartenevano al genotipo 3. In particolare, sette ceppi italiani sono risultati strettamente correlati (identità nucleotidica del 91,6-96,2%) a ceppi di HEV Europei umani e suini (Di Bartolo et al., 2008). Valori di prevalenza simili sono stati rilevati anche da Martelli et al. nel 2010. Uno studio condotto nello stesso anno ma nel centro Italia (provincia di Ascoli Piceno) ha rilevato invece prevalenze più basse: infatti l'RNA di HEV è stato amplificato solo nel 7,3% dei campioni analizzati; dall'analisi di questi ceppi è stato messo in evidenza per la prima volta in Italia il genotipo 3 sottotipo c (Di Martino et al., 2010).

Negli ultimi anni diversi studi condotti in Italia si sono concentrato sulla ricerca del virus dell'epatite E negli animali al macello (Di Bartolo et al., 2011, Di Bartolo et al., 2012) mostrando come le prevalenze in questi animali possano arrivare al 40% . La presenza di HEV in questa categoria produttiva desta delle molte preoccupazioni, sia perché il virus potrebbe contaminare le carcasse normalmente commercializzate, sia perché la sua presenza in fase di macellazione può rappresentare un rischio per gli addetti alla macellazione (Dalton et al., 2007b, Galiana et al., 2008).

Questo argomento verrà discusso in seguito nella sezione sperimentale della presente tesi di dottorato.

Ad oggi, esistono solo due studi che indagano la presenza del virus dell'epatite E nei cinghiali in Italia. Nel corso del primo studio sono state analizzate 88 bili provenienti da animali cacciati nel Parco dei Gessi Bolognesi (Emilia-Romagna) e il 25% di queste è risultato positivo per HEV. Nel secondo lavoro sono stati invece analizzati i sieri di animali provenienti da diverse provincie del Centro-Nord Italia: è stata rilevata una siero prevalenza del 10,2%. Contrariamente a quanto riportato da Martelli et al., nessun campione è risultato positivo per la presenza dell'RNA virale (Martinelli et al., 2013). La differenza tra questi risultati potrebbe essere legata al tipo di campione analizzato

Riferimento bibliografico	Fascia età/categoria di produttiva	Prevalenza feci	Prevalenza bili	Prevalenza fegati	Prevalenza muscolo	Siero-prevalenza
Di Bartolo et al., 2012	9 mesi	41,0%	n.i.	6,0%	6,0%	n.i.
Berto et al., 2012	4-9 mesi	23,0%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Di Bartolo et al., 2011	9 mesi	10,7%	38,5%	14,3%	n.i.	92,6%
	3-4 mesi	65%	68,4%	30,0%	n.i.	78,9%
Martelli et al., 2010	<80 giorni	20,0%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	80-120 giorni	46,9%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Di Martino et al., 2010	9-12 mesi	7,3%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Di Bartolo et al., 2008	90-120 giorni	42,2%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	>120 giorni	27,0%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	riproduttori	42,3%	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Martinelli et al., 2011	Scrofe	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	70,6%
	<2 mesi	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	12,1%
	2-3 mesi	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	30,8%
	4-6 mesi	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	41,5%
	> 6 mesi	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	30,8%

Tabella 3.1: studi di prevalenza e sieroprevalenza condotti in Italia nei suini.

n.i.= non indagati

3.2 HEV nei mammiferi selvatici: cinghiale, cervo e mangusta

Diversi Paesi hanno condotto studi riguardanti la circolazione di HEV nelle popolazioni autoctone di cinghiali o di maiali selvatici. Gli anticorpi anti-HEV o l'RNA virale sono stati messi in evidenza in Australia nei "wild hogs", (Chandler et al., 1999), in Giappone (Matsuda et al., 2003, Yazaki et al., 2003, Sonoda et al., 2004, Takahashi et al., 2004, Tamada et al., 2004, Li et al., 2005b, Masuda et al., 2005, Nishizawa et al., 2005), e in Francia (Carpentier et al., 2012), Germania (Schielke et al., 2009), Spagna (de Deus et al., 2008b, Boadella et al., 2012), Svezia (Widen et al., 2011), Olanda (Rutjes et al., 2010) e Italia (Martelli et al., 2008) nei cinghiali.

Le sieroprevalenze riscontrate variano molto nei diversi Stati (dal 9% al 42,7%) (Sonoda et al., 2004, de Deus et al., 2008b). Anche le prevalenze virologiche rilevate dai diversi gruppi di ricerca sono molto differenti (dal 3,1% rilevata da Michitaka et al., nel 2007 al 25% di campioni positivi nello studio di Martelli et al., condotto in Italia nel 2008). Le differenze possono essere dovute sia alla diversa sensibilità dei test diagnostici utilizzati, che alla diversa tipologia di campioni analizzati. Infatti, nel primo studio riportato sono stati analizzati dei sieri mentre nel secondo delle bili ovvero una tipologia di campione in cui HEV viene riscontrato con più facilità. Oppure tali differenze possono essere dovute a una diversa sensibilità all'infezione delle specie e sottospecie campionate nei diversi lavori; anche la densità delle popolazioni o altri fattori ambientali possono o meno favorire la trasmissione dell'infezione nelle popolazioni di cinghiali. A tal riguardo risulta interessante notare come, sulla base di diversi studi condotti in Europa, il tasso di positività degli animali non sia influenzato dal sesso e soprattutto dall'età degli animali. Infatti sono stati rilevati soggetti positivi in tutte le classi di età, dai 4 mesi ai 2 anni (Martelli et al., 2008; Nishizawa et al., 2005; Sonoda et al., 2004). In questa specie, l'infezione da HEV potrebbe diventare cronica oppure gli animali potrebbero andare incontro successive re-infezioni durante la loro vita. Quest'ultimo evento è favorito anche dalla mancanza di un'immunità proteggente a seguito della prima infezione con il virus dell'epatite E.

Come nel suino, anche nel cinghiale sembra che l'infezione da HEV decorra in maniera asintomatica e senza lesioni macroscopiche. Questa evidenza, unitamente al fatto che il virus sia presente anche in animali adulti, e quindi cacciati, aumenta la possibilità che l'uomo venga a contatto con le feci o il sangue infetto durante la caccia o la macellazione dell'animale. Anche l'ingestione degli organi (soprattutto fegato, in quanto sede di replicazione virale) o dei tessuti infetti o cross-contaminati, soprattutto se consumati senza un adeguato trattamento termico può rappresentare un rischio per l'uomo. Infatti sono stati documentati diversi casi di trasmissione alimentare all'uomo di HEV proprio in seguito al consumo di carne e/o fegato di cinghiale (Matsuda et al., 2003; Tamada et al., 2004).

Per quanto concerne il cervo, sono state rilevate diverse sieroprevalenze a seconda della zona e del genere di appartenenza. In Giappone sono stati riscontrati anticorpi anti-HEV nel 2-3% dei

cervi Sika (*Cervus nipponnippon*) e nel 35% dei cervi Yezo (*Cervus nipponyesoensis*) (Sonoda et al., 2004, Matsuura et al., 2007, Tomiyama et al., 2009). L'analisi delle sequenze di un ceppo identificato in un cervo Sika ha permesso di classificare il genotipo circolante in questa specie come genotipo 3 (Takahashi et al., 2004). Ceppi di HEV isolati dal cervo sono stati responsabili di focolai di epatite E nell'uomo in seguito al consumo di carne consumata cruda o poco cotta (Tei et al., 2003, Takahashi et al., 2004).

In Europa HEV è stato identificato dai cervi rossi in Olanda (*Cervus elaphus*) (Rutjes et al., 2010), e dai caprioli in Ungheria (*Capreolus rufus* e *Capreolus capreolus*) (Reuter et al., 2009, Forgach et al., 2010).

Infine, in Giappone sono state rilevate siero prevalenze tra l'8 e il 21% delle manguste esaminate (Li et al., 2006, Nakamura et al., 2006). Dall'analisi delle sequenze virali si è scoperto che anche in questi animali circola il genotipo 3 di HEV e che i ceppi identificati sono strettamente correlati con quelli circolanti in Giappone nei suini (Nakamura et al., 2006). Ancora non è noto quale sia il ruolo di questa specie nel ciclo di HEV e se possa essere considerata un rischio per la salute umana.

3.3 Nuovi genotipi di HEV: topi, conigli, furetti e pipistrelli

Nel 2010, in Germania è stato identificato il primo ceppo di HEV nel ratto. Dal confronto dei frammenti di genoma sequenziali con i ceppi umani e aviari si è evidenziata una identità nucleotidica del 60% e 50% di rispettivamente, portando a classificare il virus del ratto in un genotipo distinto dai 4 descritti nei mammiferi (Johne et al., 2010). I tentativi di riprodurre l'infezione nei topi con i 4 principali genotipi di HEV hanno sempre prodotto risultati fallimentari (Purcell et al., 2011). Recentemente è stato però identificato l'RNA di HEV nel fegato di 35/446 ratti provenienti sia da zone urbane che rurali di diversi Stati americani. Dall'analisi delle sequenze ottenute è emerso che tutti i ceppi tranne 1 appartenevano al genotipo 3 di HEV (Lack et al., 2012).

Nel 2009, Zhao et al. hanno inoltre scoperto un ceppo di HEV circolante nei conigli allevati ed in quelli selvatici. Sono stati evidenziati sia l'RNA che gli anticorpi specifici rispettivamente dal 7,5% e dal 57% degli animali. I ceppi identificati erano strettamente correlati tra loro (84-99%) mentre, se comparati con gli altri genotipi di HEV noti, presentavano rispettivamente il 73-77%, 70-76%, 75-82%, 71-77%, 53-65% di identità nucleotidica con i genotipi 1, 2, 3, 4 ed *avian* HEV. In base a questo studio, quindi, i conigli sarebbero i serbatoi di un genotipo 3 di HEV filogeneticamente distante da quelli identificati fino ad ora nelle altre specie; ulteriori studi andrebbero condotti per capire lo spettro d'ospite di questi ceppi virali.

Negli ultimi anni, l'aumento dell'utilizzo di tecniche di *next generation sequencing* (NGS) ha permesso di identificare altri due genotipi. Infatti, nel 2012 HEV è stato messo in evidenza in campioni

fecali di furetti domestici sani. Il ceppo circolante in questa specie appartiene a un nuovo genotipo di HEV, ben distinto dai genotipi 1-4 (Raj et al., 2012).

Infine, sempre tramite NGS, HEV è stato identificato anche nei pipistrelli. Le sequenze ottenute mostravano una netta divergenza se paragonati a tutti i genotipi sopra citati, formando anch'esso un nuovo genotipo all'interno della famiglia delle *Hepeviridae* (Drexler et al., 2012).

3.4 Avian HEV

Il primo ceppo di epatite E aviare fu identificato nel 1999 in Australia, da polli con epatomegalia e patologia a carico della milza (BLS, *big liver and spleen disease*) e il virus venne chiamato BLS virus (BLSV) (Payne et al., 1999). Anche negli Stati Uniti e Canada la sindrome di epatomegalia splenomegalia (HS syndrome) era già conosciuta nei polli, ma l'agente eziologico responsabile fu identificato per la prima volta solamente nel 2001 quando Haqshenas et al. riuscirono a identificare e caratterizzare un virus geneticamente e antigenicamente correlato con HEV umano da campioni biliari di polli con la sindrome HS (Haqshenas et al., 2001). Il genoma di *avian HEV* è più corto di quello dei mammiferi di circa 600 paia di basi, avendo una lunghezza complessiva di 6,6 Kb (Haqshenas et al., 2001). Anche se l'identità nucleotidica tra i ceppi di epatite E aviari e umani è solo del 50% circa, parti dei domini funzionali della regione ORF1 della elicasi e della metiltransferasi sono relativamente conservati. Inoltre *avian HEV* presenta diversi epitopi antigenici esposti sul capsido in comune con gli HEV isolati dai mammiferi (Guo et al., 2006; Zhou et al., 2008), supportando la conclusione che anche *avian HEV* sia un membro della famiglia *Hepeviridae* (Berke e Matson, 2000). Inoltre, il virus identificato negli USA mostra approssimativamente l'80% di identità nucleotidica con l'*Australian chicken big liver and spleen disease virus* (BLSV), suggerendo che quest'ultimo sia una variante dell'*avian HEV* (Haqshenas et al., 2001; Payne et al., 1999). La malattia è caratterizzata da un aumento della mortalità nei broiler e nelle galline ovaiole; inoltre causa una riduzione dell'ovodeposizione che può raggiungere il 20% con conseguenti perdite economiche. A livello anatomopatologico si possono riscontrare ovariti, liquido in addome e aumento di volume di milza e fegato; a livello istologico questi due organi mostrano segni di necrosi e focolai emorragici (Sun et al., 2004). Per quanto riguarda la trasmissione interspecifica, in condizioni sperimentali *avian HEV* è risultato infettivo solo per i tacchini (Sun et al., 2004). Inoltre, Zhang et al., (2008) hanno esaminato campioni collezionati da diverse specie con primers specifici per i ceppi aviari di HEV ma nessun campione è risultato positivo per la ricerca di *avian HEV*; al contrario due campioni provenienti da uccelli si sono rivelati positivi per la ricerca di ceppi dei mammiferi (Zhang et al., 2008). Il potenziale zoonotico di questo virus sembra essere basso e per ora non è stato riportato nessun caso umano riferito ad esso ed anche in condizioni sperimentali non si è riusciti a riprodurre l'infezione nei primati non umani (*Macaca mulatta*) (Huang et al., 2004).

3.5 HEV nelle altre specie recettive

Il virus dell'epatite E è stato identificato anche in altre specie animali: bovini (Hu et al., 2010), pecore (Wang e Ma, 2010) cavalli (Saad et al., 2007), gatti (Kuno et al., 2003), ostriche (Song et al., 2010) e alce (Li et al., 2013).

Nei bovini, anticorpi verso il virus dell'epatite E sono stati rilevati dal 4% al 7% degli animali in India (Arankalle et al., 2001), e dal 6% al 93% in Cina (Wang et al., 2002, Zhang et al., 2008, Yu et al., 2009, Geng et al., 2010). In quest'ultimo Paese, sono state recentemente sequenziate 189 paia di basi di HEV da campioni fecali bovini (Hu e Ma, 2010). Le sequenze identificate presentavano tra loro il 96-100% di identità nucleotidica il 76-86, 82-84%, 79-85%, 84-96% di omologia rispettivamente con i genotipi 1, 2, 3 e 4 di HEV. Sulla base della breve sequenza disponibile, risulta che questo ceppo appartiene al genotipo 4 (Hu e Ma, 2010).

Lo stesso laboratorio ha identificato anche sequenze della stessa lunghezza a partire da 6 campioni fecali di pecora. Le sequenze presentavano il 99-100 % di omologia tra di loro, ma condividevano solo il 79-85%, 81-83%, 79-84% e 85-95% di identità nucleotidica con i genotipi 1, 2, 3 e 4 di HEV (Wang e Ma, 2010). Tuttavia, sia per il bovino che le pecore l'autenticità di queste corte sequenze riconducibili al genotipo 4 dovranno essere confermate da altri studi indipendenti (Meng et al., 2011). Per quanto riguarda la sieroprevalenza, invece, sono stati rilevati tassi che variano dal 2% degli animali testati in Spagna al 10-12% in Cina (Chang et al., 2009; Peralta et al., 2009b; Zhang et al., 2008).

Alcuni studi hanno invece rilevato la presenza dell'RNA di HEV nei cavalli (Saad et al., 2007; Zhang et al., 2008). Ad esempio, in Egitto è stata investigata la prevalenza sia degli anticorpi anti-HEV che del virus in 200 campioni di siero di cavalli adibiti al traino di carri (e quindi in particolare contatto con l'uomo). La sieropositività era del 13% e il 4% degli animali sono risultati viremici (Saad et al., 2007).

Infine, in Giappone in un caso di epatite E di origine autoctona la fonte di infezione più probabile è stata individuata nel gatto domestico appartenente al paziente (Kuno et al., 2003). Questo dato è stato poi supportato da un successivo studio di sieroprevalenza in gatti domestici giapponesi, che ha dimostrato che 44 su 135 animali esaminati erano positivi per la presenza di anticorpi anti-HEV, anche se per il momento in nessun gatto è stato ancora identificato direttamente il virus (Okamoto et al., 2004).

3.6 Modalità di trasmissione di HEV nel suino

Analogamente a quanto avviene nell'uomo, si ritiene che la principale via di trasmissione nel suino sia quella oro-fecale (Meng et al., 1998b). Sperimentalmente, è stata dimostrata la trasmissione dell'infezione da animali inoculati ad animali non infettati ma tenuti a contatto con quelli inoculati, confermando la contagiosità del virus e la trasmissione diretta dell'infezione (Kasorndorkbua et al., 2004; Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b). In seguito è stata dimostrata non solo la trasmissione di HEV da suini inoculati per via endovenosa ad un gruppo di suini posti a contatto, ma anche da questi ad un ulteriore gruppo di suini recettivi all'infezione (Bouwknegt et al., 2008). Con questo studio è stato stimato, in condizioni sperimentali, il valore di R_0 . Questo parametro, che definisce il numero medio totale di nuove infezioni causate da un animale infetto in una popolazione suscettibile, per HEV nei suini è pari a 8,8 (Bouwknegt et al., 2008), dimostrando pertanto la capacità di questo virus di diffondere in modo efficacemente in questa specie.

L'infezione sperimentale per via oro-fecale seppur difficile da riprodurre è possibile, ma richiede in genere esposizioni ripetute ed elevate cariche virali (Casas et al., 2009, Kasorndorkbua et al., 2007).

E' stata ipotizzata anche la possibilità che il virus sia trasmesso da un suino all'altro attraverso l'utilizzo dello stesso ago per più animali durante le pratiche di somministrazione di farmaci o vaccini, sebbene la viremia sia transiente e di breve durata (1-2 settimane) (Kasorndorkbua et al., 2004).

La presenza di HEV è stata documentata anche nelle urine dei suini (Bouwknegt et al., 2009; Banks et al., 2004), anche se mancano degli studi effettivi che possano dimostrare l'infettività di questo secreto.

In condizioni sperimentali la trasmissione verticale di HEV non è mai stata riprodotta, anche se il virus è stato riscontrato sia nel siero che nel fegato di scrofe gravide. Un altro studio condotto in Corea del Sud ha identificato l'RNA virale contemporaneamente sia nei fegati dei feti abortiti che nelle feci e nel siero delle scrofe (Hosmillo et al., 2010).

4 Patogenesi dell'infezione nel suino

Non è ancora chiaro in che modo HEV, una volta penetrato nel suino, raggiunga il fegato né quali siano i siti iniziali di replicazione. Sebbene il fegato sia l'organo d'elezione per la diagnosi di HEV (Meng et al., 1997, Meng et al., 1998b, Williams et al., 2001), non esistono studi che evidenzino chiaramente la localizzazione sia intra- che extra-epatica del virus durante l'infezione (Choi and Chae, 2003, Ellis et al., 2004, de Deus et al., 2007). In animali infettati sperimentalmente per via endovenosa è stato possibile rilevare, tramite RT-PCR o ibridazione *in-situ*, l'RNA virale in numerosi tessuti extraepatici, (come linfonodi tonsille, milza, stomaco, rene, ghiandole salivari, polmone e intestino) sia durante la fase viremica che quando l'RNA di HEV nel siero non è più rilevabile. Questo ha fatto ipotizzare che l'acido nucleico identificato appartenga alla forma replicativa del virus e non a contaminazioni dei tessuti durante la fase viremica. Malgrado ciò, è stato possibile amplificare l'RNA a singolo filamento negativo (forma replicativa virale) solo in campioni prelevati dal tratto intestinale e dai linfonodi (Choi et al., 2003; Williams et al., 2001). L'ipotesi che HEV, una volta penetrato per via oro-fecale, prima di indurre viremia replichi a livello intestinale era già stata espressa al termine del lavoro sperimentale di Meng et al. (1998a) nel quale si osservò che l'RNA virale era riscontrabile prima nelle feci che nella bile e in quantità circa 10 volte maggiore rispetto a quest'ultima.

In condizioni naturali, le dinamiche d'infezione di HEV sono simili a quanto descritto per la maggior parte delle infezioni virali nei suini (figura 4.1). Inizialmente i suinetti sono protetti dall'infezione in quanto acquisiscono l'immunità passiva attraverso l'assorbimento del colostro (60% dei suinetti); si assiste poi a un progressivo calo del titolo di anticorpi materni fino alle 8-10 settimane di età, quindi alla sieroconversione tra le 14 e le 17 settimane di vita, momento che corrisponde con il picco della viremia, osservato a 15 settimane (40% degli animali) (Pavio et al., 2010).

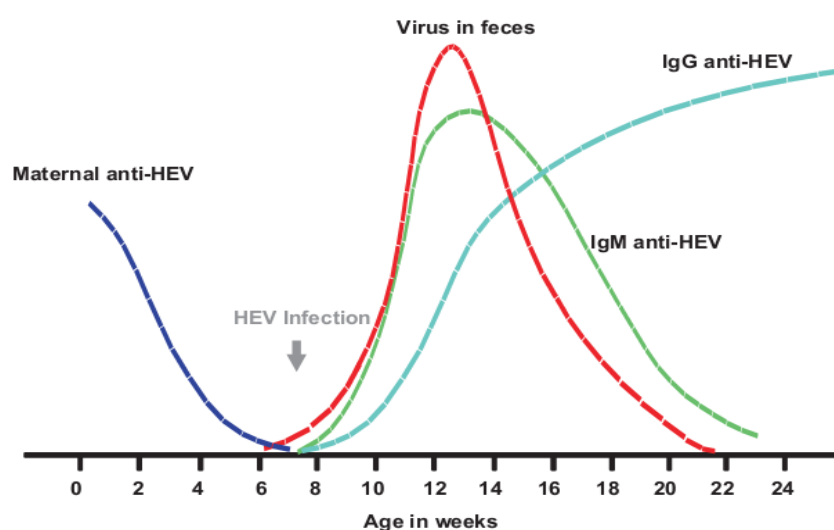


Figura 4.1: Ciclo naturale di infezione da HEV nel suino (Pavio et al., 2010).

Diversi studi di prevalenza condotti negli allevamenti confermano questo andamento dell'infezione, mostrando come HEV sia maggiormente presente in animali dai 2 ai 5 mesi di età, mentre animali con un'età minore o maggiore mostrano prevalenze molto più basse o nulle. (Hsieh et al., 1999, Pina et al., 2000, van der Poel et al., 2001, Yoo et al., 2001, Meng et al., 2002, Pei and Yoo, 2002, Choi et al., 2003, Clemente-Casares et al., 2003, Takahashi et al., 2003, Banks et al., 2004a).

La viremia generalmente dura 1-2 settimane ed è seguita dall'eliminazione fecale del virus per 3-4 settimane (generalmente in suini di 3-5 mesi di età), con conseguente sieroconversione e rimozione dell'infezione da parte del sistema immunitario (Meng et al., 1998a, Meng et al., 1998b, Hsieh et al., 1999, Haqshenas et al., 2001). L'infezione da SwHEV nel suino è quindi autolimitante e di breve durata (Meng et al., 1998a, Yazaki et al., 2003). Malgrado l'esistenza di un unico sierotipo di HEV, l'immunità acquisita dagli animali non è proteggente e questi possono andare incontro a nuove infezioni durante la vita. Infatti, recenti studi hanno dimostrato come il virus sia presente nel fegato e nelle feci di animali prossimi all'età di macellazione (Di Bartolo et al., 2011).

4.1 Sintomi e lesioni patologiche

SwHEV g3 provoca di regola infezioni subcliniche nel suino domestico, con segni di epatite rilevabili solo a livello istologico (Casas et al., 2009; Lee et al., 2009a; de Deus et al., 2007) mentre non esistono dati relativi ai cinghiali. Le lesioni rilevate variano da lievi infiltrati linfocitocitari multifocali nel tratto portale e/o irregolarmente distribuiti nel fegato a piccole aree di degenerazione vacuolare e necrosi epatica (figura 4.2) (Meng et al., 1998a, Meng et al., 1998b, Halbur et al., 2001, Williams et al., 2001, Meng et al., 2002, de Deus et al., 2008). Inoltre, alcuni studi hanno rilevato l'aumento dei livelli degli enzimi di danno epatico (ALT e AST) (Bouwknegt et al., 2009). Una recente infezione sperimentale effettuata con i primi ceppi europei appartenenti al g4 ha messo in evidenza come i suinetti infettati con questo genotipo mostrassero febbre ed aumento delle transaminasi epatiche (Hakze-van der Honing et al., 2011). Questo dato è in accordo con quanto avviene nell'uomo, dove g4 sembra essere responsabile di forme cliniche più gravi. Per quanto riguarda i genotipi 1 e 2, suini infettati sperimentalmente con ceppi di origine umana sembrano mostrare lesioni epatiche più gravi e persistenti (epatite multifocale linfoplasmacellulare e necrosi epatocellulare focale), rispetto alle alterazioni istologiche ottenute con i ceppi di origine suina (Halbur et al., 2001), ma l'infezione dei suini con i suddetti genotipi è stata riscontrata solo una volta in condizioni naturali (Caron et al. 2006).

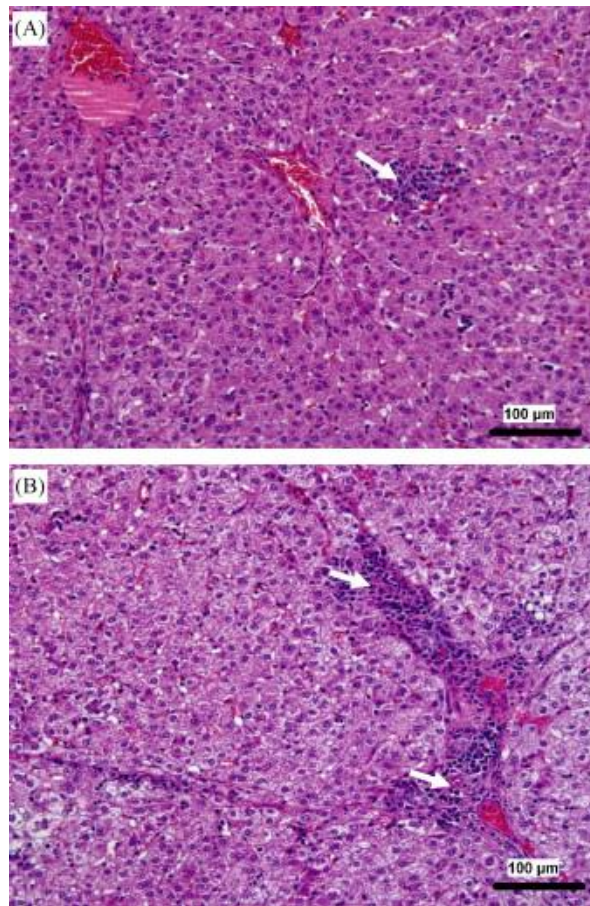


Figura 4.2: Fegati di suinetti infettati naturalmente con SwHEV g3.

(A) lievi infiltrati linfocitari multifocali irregolarmente distribuiti nel fegato;

(B) moderata infiammazione linfocitaria nel tratto portale. Ematossilina/eosina ($\times 20$) (de Deus et al., 2008).

5 Diagnosi

Nell'uomo l'epatite E si presenta clinicamente indistinguibile dagli altri tipi di epatite virale acuta mentre negli animali (ad eccezione delle specie aviarie) l'infezione decorre in maniera asintomatica. Per questo motivo una diagnosi precisa deve essere basata su test diagnostici di laboratorio (sierologici e ricerca di RNA virale) (Rodríguez-Frias et al., 2012).

Numerose tecniche per la diagnosi, sia diretta che indiretta, sono disponibili per le infezioni da HEV. Queste tecniche presentano sensibilità e specificità differenti, rendendo così difficile l'identificazione di un optimum diagnostico, soprattutto nel suino in cui la malattia si presenta asintomatica. Di seguito verranno elencate solo le più comuni tecniche utilizzate per la diagnosi diretta ed indiretta di HEV.

5.1 Diagnosi diretta

I campioni di partenza per l'identificazione diretta di HEV sono principalmente siero e campioni fecali, sia nell'uomo che nel suino. In quest'ultimi l'RNA virale viene estratto anche a partire da organi (fegato, linfonodi, intestino) o da bile (de Deus et al., 2007) di animali in fase di macellazione o in sede autoptica.

5.1.1 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

La PCR è sicuramente la tecnica maggiormente utilizzata per diagnosticare HEV. Ad oggi sono disponibili primers degenerati (vedi capitolo 6) che amplificano diverse regioni conservate del genoma di tutti e 4 i genotipi virali. Generalmente i protocolli diagnostici presenti in letteratura prevedono l'utilizzo di protocolli di *nested PCR* per aumentare la sensibilità della tecnica. Questo particolare tipo di PCR prevede infatti l'utilizzo di primers interni alla regione amplificata in una seconda reazione di PCR. Nella maggior parte dei casi, infatti, i prodotti della prima amplificazione non sono quantitativamente sufficienti per essere visualizzati in una corsa elettroforetica ma, se amplificati una seconda volta, sono chiaramente visibili. A differenza di quanto avveniva in passato, in cui i protocolli per la diagnostica di HEV mediante RT-PCR utilizzavano primers che amplificavano regioni molto corte del genoma virale, oggi si preferiscono primers che amplificano frammenti di almeno 350 bp in modo da rendere più attendibili le eventuali analisi filogenetiche e la sottotipizzazione dei ceppi.

5.1.2 Real-Time RT-PCR

Questo tipo di PCR consente l'amplificazione di segmenti specifici di genoma virale accompagnata da una contemporanea quantificazione del numero di copie. Il termine *Real-Time* deriva dal fatto che la misurazione del segnale per ciascun ciclo avviene in tempo reale, mentre la PCR è in atto: il software connesso allo strumento è in grado di leggere la fluorescenza disegnando le curve di amplificazione. Non è quindi necessaria la corsa elettroforetica successiva all'amplificazione e in più, rispetto alla PCR tradizionale si possono avere dati quantitativi molto accurati (Kubista et al., 2006).

Esistono diversi protocolli di *Real-Time* PCR, distinti in base al tipo di molecola che emette fluorescenza: attualmente la maggior parte dei protocolli impiegati per la diagnosi di HEV prevedono l'utilizzo della tecnologia Taqman, che prevede l'utilizzo di una sonda specifica per ogni virus marcata con un *dye*, e che viene definita *probe*. La sonda viene inglobata nel processo di amplificazione mediato dai primers e, una volta incorporata, libera il *dye* presente alla sua estremità terminale, che solo a questo punto emette fluorescenza. Maggiore è la quantità di molecole fluorescenti nel campione, maggiore è il numero di copie di DNA sintetizzato nel processo di amplificazione (Kubista et al., 2006).

I protocolli generalmente utilizzati per la diagnosi di HEV prevedono l'utilizzo di quest'ultima tipologia di reazione. Essi utilizzano primers e sonde disegnati in regioni genomiche conservate e pertanto utilizzabili sia per la diagnosi negli animali che nell'uomo (Jothikumar et al., 2006).

In generale, i protocolli *Real-Time* sono più sensibili rispetto a quelli di PCR convenzionale, anche se nel caso della nested-PCR la differenza si riduce di molto. A questo proposito, quando comparati utilizzandoli sugli stessi campioni, è stato dimostrato che con il protocollo *Real-Time* il 30,5 % dei testati era positivo, mentre con la nested-PCR solo nel 20% dei campioni era possibile visualizzare una banda a seguito di corsa elettroforetica (Zhao et al., 2007).

Recentemente (Baylis et al., 2013), il World Health Organization (WHO) ha effettuato un ring test tra 23 laboratori di 10 Paesi diversi per definire l'efficacia dei metodi di Real-Time utilizzati dalle diverse unità in relazione ad un ceppo di riferimento utilizzato come Internal Standard (IS) fornito dal WHO stesso. Benché i risultati quantitativi ottenuti siano diversi a seconda del protocollo utilizzato, la metodica è risultata molto sensibile. Sulla base di questo studio il WHO cercherà di sviluppare un Controllo Universale, al fine di poter paragonare tra loro i risultati quantitativi forniti dai diversi laboratori.

5.2 Diagnosi indiretta

L'appartenenza dei 4 genotipi di HEV ad un unico sierotipo ha favorito lo sviluppo di test diagnostici universali di tipo immunologico, come l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Attualmente sono disponibili diversi kit per l'individuazione di anticorpi specifici (anti-HEV) IgG e IgM indipendentemente dal genotipo di HEV coinvolto (Rodríguez-Frias et al., 2012). Queste tecniche utilizzano antigeni virali ricombinanti pORF2 e/o pORF3 e rivelano mediante saggio indiretto o "sandwich" la presenza di anticorpi diretti contro l'antigene virale (Khudyakov et al., 2011).

Le differenze in sensibilità e specificità, per quanto riguarda le tecniche sierologiche, sono particolarmente rilevanti nella diagnosi d'infezione da HEV. Un recente lavoro ha confrontato tra loro 6 differenti protocolli ELISA per la ricerca di IgM anti-HEV (4 di tipo commerciale e 2 messi a punto in laboratorio) evidenziando differenze significative sia in termini di sensibilità (dal 72 al 98%) che di specificità (dal 78 al 98%) (Drobeniuc et al., 2010). Queste differenze si devono principalmente a una bassa sensibilità per la rilevazione di IgM anti-HEV nella fase convalescente (più falsi negativi rispetto ai falsi positivi) (Khudyakov et al., 2011). I test sierologici sono in grado di differenziare tra IgM e IgG. Le IgM anti-HEV compaiono durante la fase acuta della malattia, si rilevano in oltre il 90% dei pazienti nelle prime 2 settimane dopo l'insorgenza dell'ittero, raggiungendo il picco nel periodo sintomatico e permanendo rilevabili per 4-5 mesi costituendo un marcatore molto utile nella diagnosi di infezione acuta (Khudyakov et al., 2011). E' stata investigata anche la possibilità di ricercare IgA anti-HEV nella diagnosi di infezione acuta, osservando che la rilevazione di IgA anti-HEV da sola o insieme a IgM portano ad un aumento della specificità nella diagnosi di infezione acuta (Takahashi et al., 2005). La risposta di IgG anti-HEV comincia simultaneamente o poco dopo la comparsa di IgM, aumenta durante la fase acuta e in convalescenza, permanendo fino a 1-14 anni dopo l'infezione, anche se i livelli diminuiscono col tempo (Khudyakov et al., 2011).

Uno dei problemi principali della diagnosi sierologica di HEV è la possibilità di avere dei falsi positivi causati da reazioni crociate con altri virus. Nello specifico nell'uomo sono stati riportati casi di cross-reattività nei confronti dell'Epstein-Barr virus e del Cytomegalovirus (Fogeda et al., 2009; Hyams et al., 2014). Inoltre potenziali falsi positivi sono stati descritti anche per campioni positivi per il virus dell'epatite A (Gray et al., 1992). Questa cross-reattività potrebbe parzialmente spiegare le elevate sieroprevalenze riscontrate nell'uomo a fronte di un limitato numero di casi confermati.

Per la diagnosi sierologica negli animali, vengono generalmente adottati ELISA commerciali utilizzati per la diagnosi nell'uomo, cambiando semplicemente l'anticorpo secondario: in questi casi viene infatti utilizzato un antisiero specifico a seconda della specie in esame (Clemente-Casares et al., 2003). In alternativa, in alcuni studi i campioni sono stati analizzati mediante ELISA "in-house" utilizzando pORF2 e pORF3 ricombinati appartenenti ai diversi genotipi virali (Mizou et al., 2002).

PARTE SPERIMENTALE

6 Circolazione del virus dell'epatite E nei suini in diverse regioni d'Italia

6.1 Introduzione

L'obiettivo di questo studio è stato quello di monitorare la presenza di HEV nei suini di diverse fasce di età e provenienti da diverse Regioni italiane, così da poter valutare la variabilità genetica dei ceppi circolanti e la loro eventuale vicinanza a ceppi umani provenienti sia da altri Paesi europei sia extra-EU. In questi ultimi Paesi, l'infezione ha un'epidemiologia molto diversa e, nella trasmissione all'uomo, sono coinvolti sia i suini domestici sia animali selvatici (es. cinghiali, cervi).

Il primo monitoraggio, iniziato già nel 2011, ha riguardato la ricerca di HEV in suini all'ingrasso clinicamente sani insieme all'analisi, dal 2012, di campioni provenienti da allevamenti sia dal centro sia dal sud Italia con lo scopo di ottenere sequenze nucleotidiche di ceppi provenienti da diverse Regioni. In un secondo momento sono state analizzate feci provenienti da suini con diarrea al fine di valutare la prevalenza di HEV in animali con patologia enterica in atto o comunque l'interazione del virus con un microbiota complesso. Infine è stato effettuato uno studio retrospettivo da campioni fecali prelevati nel 2000 e provenienti da 3 allevamenti del Nord Italia per valutare la presenza di HEV a pochi anni dalla descrizione del primo caso umano autoctono in Italia (Zanetti et al., 1999) (vedi tabella 6.1).



Figura 6.1: mappa delle province in cui sono stati effettuati i campionamenti di feci dai suini.

Campionamenti				
Provincia	Numero allevamenti campionati	Numero animali campionati	Anno di campionamento	Totale animali campionati per Provincia
Modena	2	100	2010	143
		43	2012	
Ferrara	1	45	2012	45
Brescia	3	24	2000	78
		25	2000	
		29	2000	
Cuneo	1	23	2012	23
Viterbo	1	9	2012	9
Perugia	5	9	2012	61
		13	2013	
		13	2013	
		13	2013	
		13	2013	
Ancona	2	16	2012	29
		13	2013	
Potenza	2	8	2012	15
		7	2012	
Cosenza	1	11	2012	11
Palermo	1	7	2012	7
Totale	19	421		

Tabella 6.1: campioni di feci di suino analizzati, suddivisi per anno di campionamento, provincia e allevamento.

In sintesi: tra 2011-2013 sono stati analizzati 421 campioni di feci di suino, provenienti da 19 allevamenti situati in 10 provincie del territorio italiano (vedi figura 6.1 e tabella 6.1).

6.2 Sorveglianza del virus dell'epatite E negli allevamenti suini dal 2011 al 2013

6.2.1 Materiali e metodi

6.2.1.1 Campionamento

➤ Nel 2011, sono stati analizzati campioni fecali di 100 suini senza sintomatologia clinica apparente, prelevati nel 2010 nel settore di ingrasso di un allevamento multisito della provincia di Modena. Gli animali da cui sono stati effettuati i prelievi appartenevano a diverse classi di età: dai 110 ai 300 giorni di vita.

➤ Nel 2012, sono stati esaminati 96 campioni di feci prelevati da altrettanti suini di 3 classi d'età (3-10; 10-30 e 30-90 giorni di vita), affetti da diarrea. I campioni sono stati raccolti in allevamenti dell'Emilia-Romagna e della Basilicata.

➤ Dallo stesso anno, al fine di ottenere delle sequenze di ceppi virali provenienti da suini allevati in altre Regioni d'Italia (soprattutto Centro e Sud), sono stati analizzati 133 feci di suini di 80-100 giorni di vita collezionati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) durante piani di sorveglianza per *Brachispira spp.* Gli allevamenti campionati erano siti in Provincia di Perugia, Viterbo, Cuneo, Cosenza e Ancona. Nello stesso anno sono stati analizzati 15 campioni provenienti dalla provincia di Potenza e 7 dalla provincia di Palermo; quest'ultimi sono stati prelevati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.

I campioni sono stati prelevati in alcuni casi con tamponi rettali sterili, presi singolarmente oppure collezionati da terra in corrispondenza di un singolo animale; le feci sono state risospese in acqua sterile, 10% (gr/vol), e conservati in aliquote a -20°C fino al loro utilizzo.

6.2.1.2 Trascrizione inversa-Nested-PCR e analisi di sequenza

Le procedure di estrazione e amplificazione dell'RNA virale sono state le medesime in tutti i campioni analizzati. Nello specifico, l'RNA virale è stato estratto da 180 µl di sospensione fecale (10% acqua DEPC) ed eluito in 80 µl di acqua DEPC, utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) seguendo le istruzioni riportate dal produttore. L'RNA totale è stato quindi analizzato mediante trascrizione inversa e PCR (RT e PCR eseguite in un unico passaggio) utilizzando il kit QIAGEN One-Step RT-PCR (Qiagen). Vista la bassa efficienza della prima amplificazione legata all'esigua quantità di RNA virale presente generalmente nei campioni, alla prima PCR è stata fatta seguire una nested o una seminested-PCR utilizzando primers interni alla regione in precedenza amplificata impiegando GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

La ricerca del genoma di HEV è stata effettuata amplificando una regione all'interno della proteina capsidica, gene *ORF2*, utilizzando diverse coppie di primers degenerati in grado di riconoscere tutti i genotipi di HEV (vedi figura 6.2). Nello specifico, gli RNA estratti dai campioni prelevati nel 2010 sono stati retroscritti e amplificati usando i primers di Huang et al., 2006 (PCR n° 1 nella tabella 6.2) mentre per quelli prelevati dal 2012 in poi sono stati utilizzati i primers descritti da Mizuo et al., 2002 (PCR n° 2 nella tabella 6.2).

A conferma della positività ottenuta con i primers della regione capsidica e per poter effettuare studi di filogenesi, i campioni risultati positivi in questa prima RT-Nested PCR sono stati analizzati con altre RT-PCR e Nested utilizzando coppie di primers degenerati (PCR n° 4, 5, 6, 7 nella tabella 6.2) che amplificano frammenti della Metiltrasferasi e dell'RNA dipendente RNA polimerasi (RdRp) all'interno della *ORF1* (vedi figura 6.2)

PCR e Primer utilizzati per la diagnostica di HEV nel suino

PCR n°	Nome primer	Sequenza del primer	Frammento amplificato (bp)	Regione amplificata	Riferimento bibliografico
1	3156n Fw	aattatgcycagtaycggrgttg	710	Capsidica	Huang et al.,2006
	3157N Rw	cccttrtcygtctgmgcattctc			
	3158N Fw	gtwatgctygtcatwcatggyt	348		
	3159N Rw	agccgacgaaatcaattctgtc			
2	HE40 Rw	cccttrtcctgctgagcrttctc	506	Capsidica	Mizuo et al., 2002
	HE044 Fw	caagghtggcgytckgttgagac			
	HE110 Fw	gytckgttgagacctcyggggt	458		
	HE041 Rw	acwgtcrgctcgccattggc			
3	1669 Fw	ggygacgcytatgaggagt	299	RdRp	La Rosa et. al 2010
	1670 Rw	gctatratygccatrttcca			
	1671 Fw	tggttrttgaraatgaytt	163		
	1672 Rw	agagactccttcggcgctg			
4	HEVORF1con-s1 Fw	ctggcatyactactgcyattgagc	418	Metiltrasferasi	Erker at al., 1999
	HEVORF1con-a1 Rw	ccatcrarrcagtaagtgcggtc			
	HEVORF1con-s2 Fw	ctgccytkgcgaatgctgtgg	287		
	HEVORF1con-a2 Rw	ggcagwrtaccarcgctgaacatc			

PCR n°	Nome primer	Sequenza del primer	Frammento amplificato (bp)	Regione amplificata	Riferimento bibliografico
5	HEVORF1con-s1 Fw	ctggcatyactactgcyattgagc	825	Metiltrasferasi	* Primer Reverse disegnato nel nostro laboratorio su ceppi suini italiani .
	853 RW*	gccttatgtccrtaccc			
	HEVORF1con-s2 Fw	ctgccytkgcgaatgctgtgg	800		
	853 RW*	gccttatgtccrtaccc			
6	EAP 4576 RW	agggtgccgggctgccgga	349	RdRp	Zhai et al., 2006
	ISP4232I Fw	gtatttcggcctggagtaagac			
	IAP4561 Rw	tcaccggagtgyttcttcagaa	329		
	ISP4232 Fw	gtatttcggcctggagtaagac			
7	ESP Fw	cgagggttgacaaatgttgcg	430	RdRp	Y. Kabrane-Lazizi et al., 2001
	EAP Rw	cgggttgrgaaacgacatcg			
	ISP Fw	ccgtgtttatggagtagccc	321		
	IAP Rw	tgagaatcaaccctgtca			

Tabella 6.2: primers utilizzati per la diagnostica di HEV nel suino.

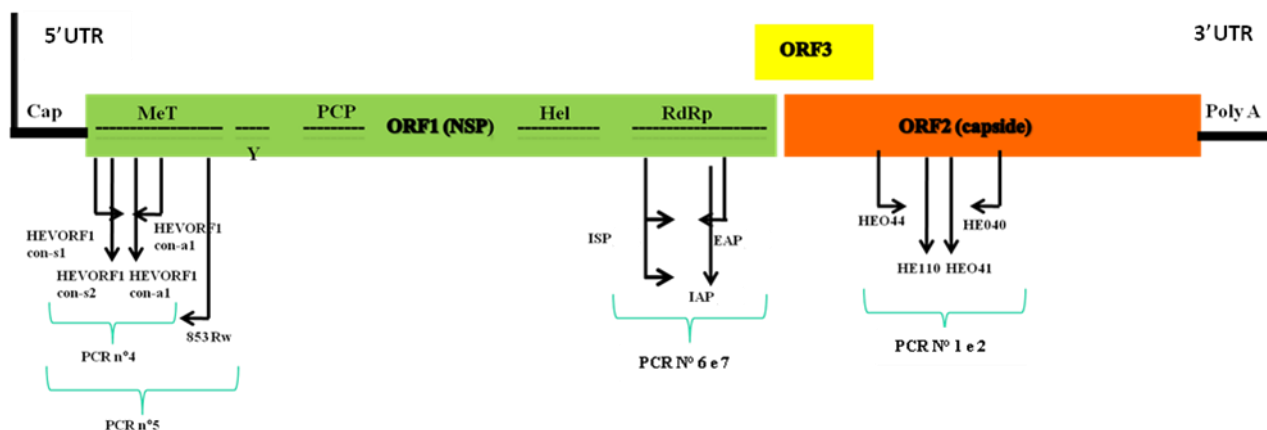


Figura 6.2: organizzazione genomica di HEV e posizione dei primers utilizzati per le PCR.

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante visualizzazione su gel di agarosio colorato con Gel-Red nucleic acid gel stains (Biotium). La dimensione della banda di DNA attesa dalle singole PCR effettuate è indicata in Tabella 3. Gli amplificati ottenuti sono stati purificati direttamente dal prodotto di PCR utilizzando l'enzima USB ExoSAP-IT (Affymetrix). Nel caso in cui il prodotto di PCR presentasse anche delle bande aspecifiche di dimensioni differenti rispetto a quella ricercata, tutto l'amplificato è stato caricato su gel di agarosio e il DNA purificato direttamente dal gel di agarosio con il kit Wizard® SV Gel (Promega). Quando la quantità di DNA era sufficiente, gli ampliconi sono stato sequenziati utilizzando ABI PRISM BigDye Terminator kit version 2.0 (Applied Biosystems); l'analisi dei cromatogrammi, la costruzione dei contig, l'allineamento delle sequenze e la costruzione degli alberi filogenetici, sono state eseguite con Bionumerics software packages (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). L'albero in figura 6.4 è stato costruito con il metodo neighbor joining, fattore di correzione kimura 2, bootstrap 100.

6.2.2 Risultati

➤ Il 27% (27/100) (tabella 6.3) degli animali senza sintomatologia clinica è risultato positivo per la presenza del genoma di HEV. Il genoma di HEV è stato riscontrato nel 20% (3/15), 33,3% (10/30), 16% (4/25), 20% (3/15) e 70% (7/10) dei campioni provenienti, rispettivamente, da soggetti di 110, 140, 160, 210 e 300 giorni di età (vedi figura 6.3). I campioni positivi sono stati in seguito analizzati utilizzando i primers che appaiano nella *ORF1* (PCR n° 7) e solo nel 40% (11/27) dei casi è stata riconfermata la positività del campione, dimostrando che i due metodi hanno una sensibilità differente.

HEV positivi/totale esaminati - 2010 -		
	Capsidica (PCR n° 1)	RdRp (PCR n° 6)
Totale	27/100 (27%)	11/27* (40%)

Tabella 6.3: risultati della ricerca del genoma di HEV nei campionati prelevati nel 2010. Vengono riportati i risultati dell'analisi mediante RT-PCR utilizzando coppie di primers che amplificano un frammento della proteina del capsido o della RdRp. *campioni positivi per la presenza di HEV mediante RT-nPCR nella regione diagnostica della proteina capsidica.

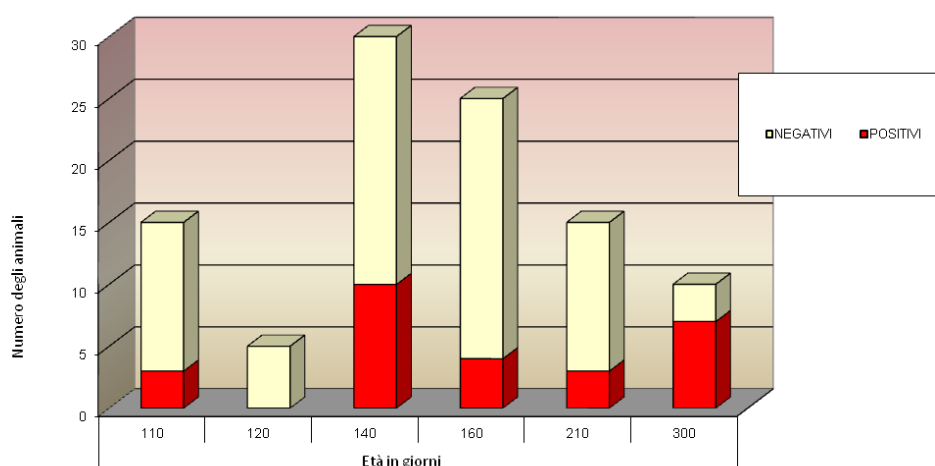


Figura 6.3. prevalenza di HEV negli animali delle diverse classi di età.

Di particolare interesse risulta essere l'elevata prevalenza di HEV riscontrata (7/10) negli animali di 300 giorni di età, sebbene la scarsa numerosità dei campioni esaminati renda questa osservazione scarsamente significativa. Infatti, benché in letteratura sia riportato che SwHEV ha la massima prevalenza in animali di 2-5 mesi di età, recenti lavori ne hanno dimostrato la presenza anche in animali prossimi alla macellazione (Fernandez-Barredo et al., 2007) e nei riproduttori (Di Bartolo et al., 2008). La positività degli animali di questa fascia di età crea qualche preoccupazione relativamente al rischio di trasmissione zoonotica dell'infezione mediante il consumo di carne o organi

contaminati poco cotti, la possibile contaminazione domestica di prodotti da consumare crudi e la possibilità di contaminazione crociata dei prodotti carnei crudi durante la macellazione.

Al fine di identificare i prodotti amplificati e caratterizzare i ceppi di SwHEV, gli ampliconi di DNA da 348 bp ottenuti da 10 animali sono stati sequenziati e confrontati con sequenze di ceppi di riferimento suini e umani presenti in GenBank (NCBI).

L'analisi delle sequenze ha confermato che in tutti i casi si trattava di ceppi di SwHEV appartenenti al genotipo 3, a cui appartengono tutti i ceppi indigeni suini identificati in Europa fino ad oggi (vedi figura 6.4). In particolare 7, ceppi risultano appartenere al sottotipo c del genotipo 3 (in rosso nella figura 6.4); essi presentano tra loro un'identità nucleotidica di grado variabile, compresa tra l'88,7% e il 100%. Un ceppo (evidenziato in blu) appartiene al sottotipo f del genotipo 3 presenta con gli altri ceppi un'identità nucleotidica del 76%. Inoltre, il confronto con altri ceppi suini e umani identificati in Italia, evidenzia la vicinanza con altri ceppi appartenenti al genotipo 3 di origine suina, identificati già dal 2006 in Italia (vedi Key indicati da nome x_IT_06, figura 6.4).

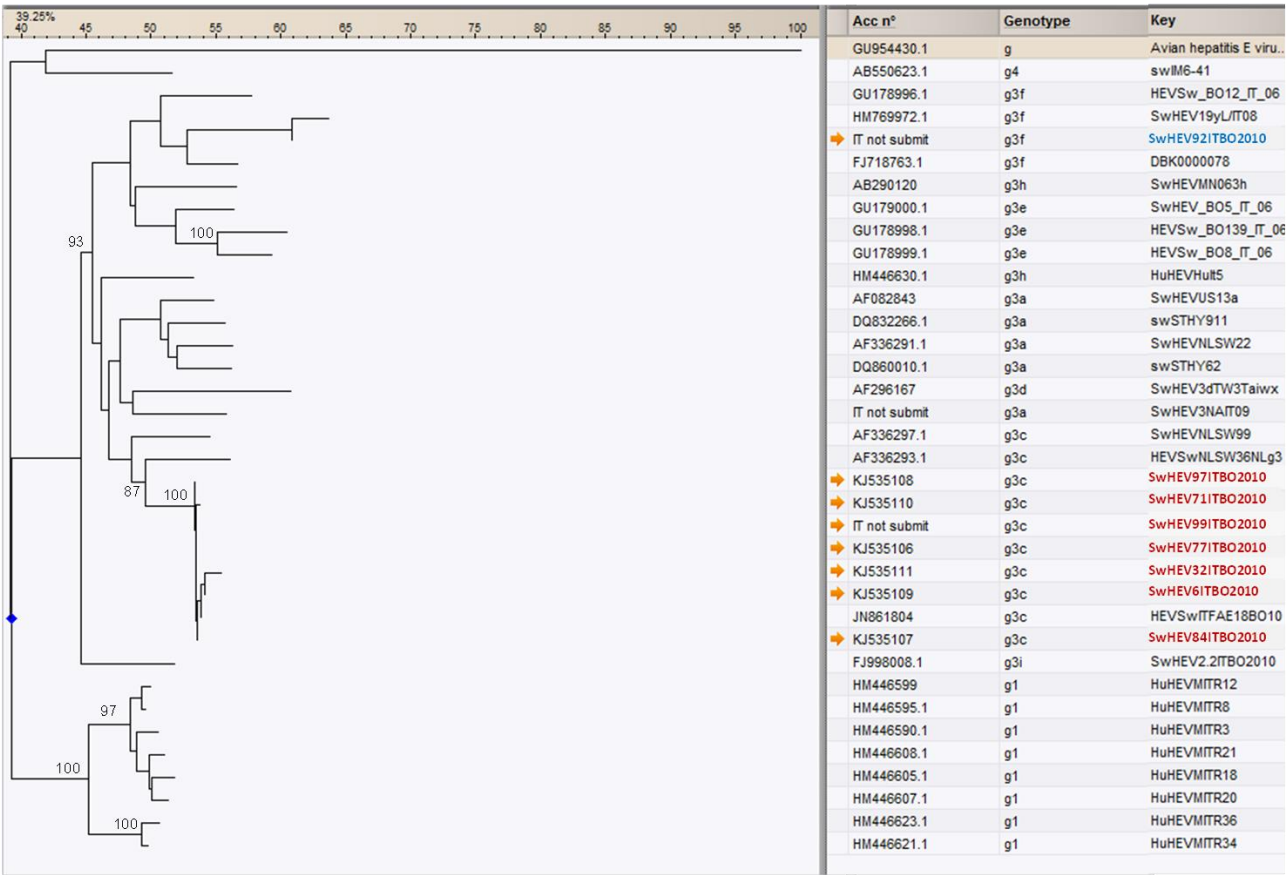


Figura 6.4: Albero costruito con il metodo neighbor joining, fattore di correzione kimura 2, bootstrap 100 sulla base del frammento di circa 250 nt della regione capsidica utilizzata per la diagno-

stica (vedi testo); vengono riportati sia i ceppi suini di HEV sequenziati in questo studio (indicati con la freccia arancione) che i ceppi umani (HuHEV) e suini (SwHEV) presenti in GenBank. Le sequenze ottenute in questo studio sono state depositate in GenBank, eccetto quelle di lunghezza inferiore ai 250 nt (indicate come IT not submitted).

La figura 6.5 riporta invece l'allineamento di frammenti sia nucleotidici che amminoacidici della ORF2 di due ceppi suini identificati in questo lavoro e un ceppo umano descritto in Italia (Romanò et al., 2011). Nella regione in oggetto sono presenti 9 sostituzioni nucleotidiche tra i due ceppi suini identificati nell'allevamento in esame che corrispondono a 4 mutazioni missenso (alcune delle quali sono evidenziate con un ellisse in giallo) e 5 mutazioni silenti (in blu). Inoltre, confrontando il ceppo SwHEV13ITBO2010 con quello umano si evidenziano 40 sostituzioni nucleotidiche che corrispondono a 3 mutazioni missenso (in giallo) e 37 mutazioni silenti. I risultati ottenuti dall'allineamento, dimostrano che all'elevata variabilità nucleotidica, che caratterizza i ceppi di HEV, non corrisponde una variabilità amminoacidica se non in misura ridotta, essendo la maggior parte delle mutazioni silenti (alcuni esempi sono evidenziati in blu). Va altresì ricordato che la regione analizzata corrisponde proprio alla regione che codifica per la proteina capsidica che essendo l'unica o la principale (il ruolo della pORF3 non è ancora ben noto) proteina strutturale, sarà soggetta alla risposta immunitaria dell'ospite. Questo dato in parte conferma la possibilità che, se la proteina del capsido fosse l'unica legata alla neutralizzazione del virus, esista un solo sierotipo di HEV come ritenuto sino ad oggi. Questo dato, ottenuto dal confronto di una breve regione della proteina del capsido, è stato confermato in seguito dal paragone del full genome di uno dei ceppi identificati nel 2012 (vedi capitolo 7).

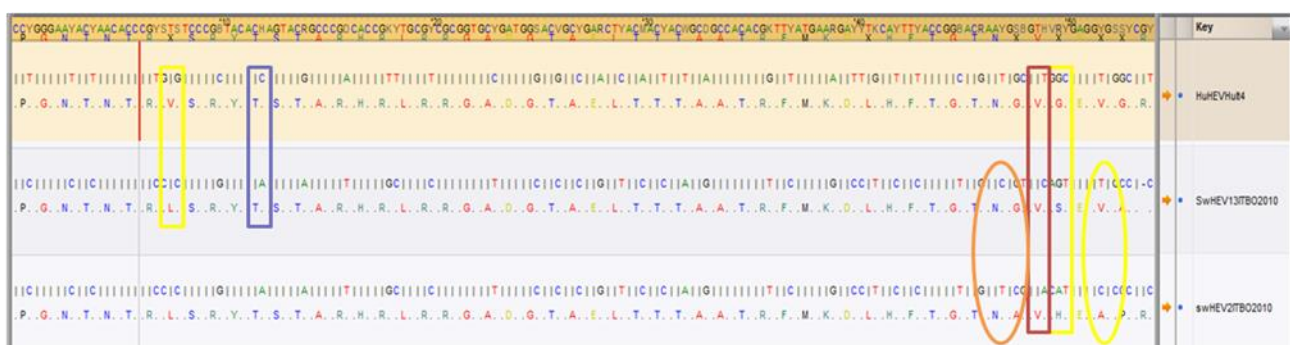


Figura 6.5: allineamento della sequenza nucleotidica e amminoacidica di due frammenti di SwHEV sequenziati in questo studio e un frammento di HuHEV (indicato come HuIT4, Romanò et. al, 2011).

➤ Negli animali con sintomatologia enterica il genoma di HEV è stato rilevato in 33 campioni provenienti da animali di tutte le fasce di età (34,4%), con prevalenza più alta (52,2%) nella fascia di età 60-120 giorni (tabella 6.4 e figura 6.6). Al fine di ottenere altre regioni del genoma virale, i campioni positivi sono stati analizzati con altre coppie di primers che amplificano frammenti del gene *ORF1* (vedi tabella 6.2). Anche in questo caso i primers che appaiano sulla regione del capside risultano essere maggiormente sensibili (vedi in tabella 6.4).

Campioni prelevati da animali con diarrea			
Positivi/totale analizzati		Positivi/campioni capsidica positivi	
Età (giorni)	Capsidica (PCR n°2)	Metiltrasferasi (PCR n°4/5)	RdRp (PCR n°6)
10-30	3/17 (17,7%)	0/2*	2/3
30-60	18/56 (32,1%)	16/18	8/16*
60-120	12/23 (52,2%)	10/12	9/12
Totale	33/96 (34,4%)	26/32* (81,25%)	19/31* (61,3%)

Tabella 6.4: risultati ottenuti per la ricerca del genoma di HEV mediante RT-nested PCR. I risultati vengono riportati come numero di animali positivi sul totale di animali analizzati, suddivisi per le fasce di età. La terza e la quarta colonna riportano il numero dei campioni risultati positivi utilizzando coppie di primers che appaiano rispettivamente sulla Metiltrasferasi e sulla RdRp virale e le percentuali di campioni confermati con l'utilizzo di questi primers. * alcuni dei campioni non sono stati analizzati.

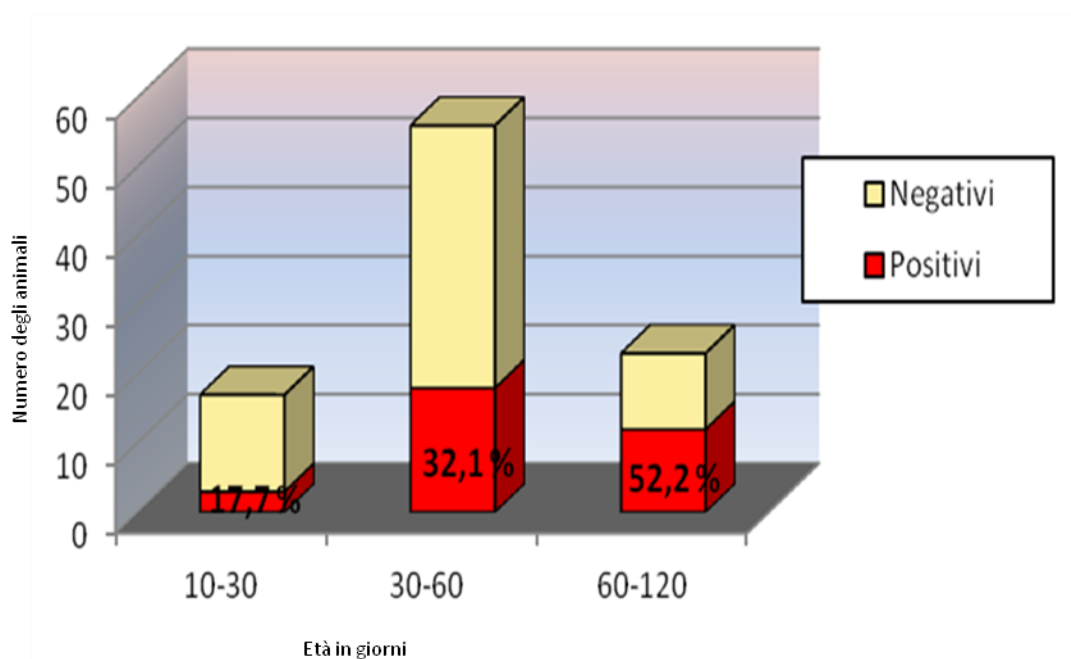


Figura 6.6: prevalenza per SwHEV in funzione della fascia di età degli animali esaminati. I risultati si riferiscono alla RT-nested PCR con i primers che amplificano il frammento della regione capsidica.

Dei 33 campioni positivi per HEV sono stati sequenziati 20 frammenti della regione capsidica, 19 della Metiltrasferasi e 6 della RdRP. Le sequenze con una lunghezza maggiore di 250 nt sono state depositate in GenBank. Dall'analisi filogenetica è emerso che tutti i ceppi appartenevano al genotipo 3. Inoltre è stato messo in evidenza l'esistenza di gruppi di ceppi (cluster) distinti per ogni allevamento indagato. Infatti, come riportato nella figura 6.7, i ceppi isolati nei due allevamenti della Provincia di Potenza (indicati nel grafico con un puntino nero) formano un cluster separato rispetto ai ceppi identificati nell'allevamento sito in Provincia di Ferrara (indicati con una stella) e a quello identificato in Provincia di Modena (indicato con un triangolo). I 3 cluster identificati sono separati rispetto a quelli identificati nel 2010 (figura 6.8), mostrando con essi una percentuale di identità nucleotidica del 76-78%. Inoltre, all'interno del gruppo delle sequenze identificate nella provincia di Potenza si possono evidenziare altri due ulteriori cluster corrispondenti ai due diversi allevamenti campionati; i ceppi mostrano tra loro l'88,5% di identità nucleotidica nella regione capsidica e l'84% nella MTasi. Infine, sempre per quanto riguarda questi campioni, è interessante evidenziare che un ceppo (SwHEVE4NA2012), avente un'identità nucleotidica dell'84,5% con gli altri ceppi suini della stessa Provincia, mostra un'elevata identità (91%, risultato allineamento ottenuto in BLAST, non riportato) con un ceppo umano identificato in Inghilterra (Ijaz et al., 2013).

I ceppi messi in evidenza nell' allevamento della Provincia di Modena mostrano tra loro un range di identità che varia dall'84% al 100%. Inoltre, dall'analisi delle sequenze nucleotidiche 4 ceppi risultano identici; analizzando le sequenze aminoacidiche i ceppi identici diventano 9.

Diciotto ceppi sono stati sottotipizzati e 10 appartenevano al sottotipo h, 1 al sottotipo c, 6 al sottotipo f ed 1 al sottotipo e. La distinzione in sottotipi è la stessa anche analizzando i frammenti della MTasi e della RdRp virale. Non è risultata nessuna relazione tra le fasce d'età e il sottotipo identificato, mentre la distribuzione dei sottotipi segue la distribuzione geografica: nell'allevamento in Provincia di Ferrara sono stati identificati sia il sottotipo h che il c, il sottotipo f è stato l'unico identificato nei due allevamenti di Potenza, mentre il sottotipo e è stato identificato nell'allevamento in Provincia di Modena (Figura 6.7).

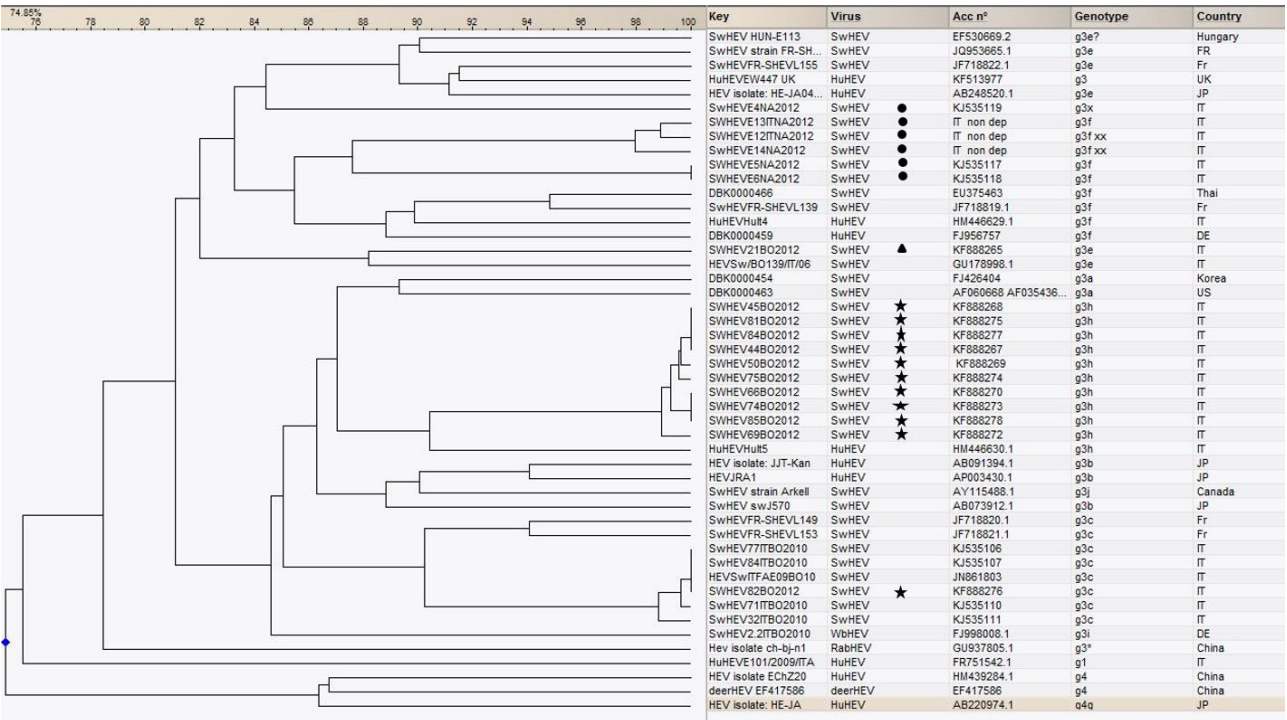


Figura 6.7: dendrogramma, costruito con il metodo UPGMA, dei frammenti della capsidica di alcuni dei ceppi sequenziati nel 2012. In figura sono indicati con un puntino i ceppi provenienti da animali campionati nella Provincia di Potenza, con una stella quelli della Provincia di Ferrara e con un triangolo quelli della Provincia di Modena. In alto è riportata la scala delle percentuali.

Nel 2013 sono stati analizzati 7 campioni provenienti dalla Provincia di Potenza (in collaborazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"), 7 raccolti in Provincia di Palermo (collaborazione con l'IZS della Sicilia) e 133 campioni fecali provenienti dalla Regione Umbria collezionati dall'IZSUM, 68 dei quali raccolti durante i piani di sorveglianza

per *Brachyspira spp.* e *Lawsonia intracellularis*. Di questi ultimi campioni, 62 erano positivi per almeno uno dei batteri. Nessun campione è risultato positivo per HEV con nessuna delle coppie di primers normalmente utilizzate per la diagnostica. Pertanto tutti i campioni sono stati analizzati anche mediante la più sensibile metodica di Real-Time PCR (vedi materiali e metodi, capitolo 8). I campioni sono stati anche analizzati diluendo di dieci volte sia l'RNA che il DNA ottenuto dalla *one-step* RT-PCR al fine di diluire eventuali inibitori presenti, ma senza ottenere nessun ulteriore risultato positivo.

Gli altri 65 campioni fecali ricevuti dall'IZSUM sono stati raccolti durante altri piani di sorveglianza da suini di 80-120 giorni di età. In questo caso il 27,7 % dei campioni è risultato positivo per HEV. Come per i precedenti lavori, tutti i campioni positivi in PCR per la proteina del capsidico sono stati analizzati con altre coppie di primers al fine di ottenere sequenze di più regioni genomiche (vedi tabella 6.5). Dei 7 campioni collezionati in Provincia di Potenza, 4 (57,1%) sono risultati positivi in tutte e tre le regioni genomiche indagate.

I campioni raccolti nella Provincia di Palermo sono risultati negativi.

Campioni fecali analizzati nel 2013			
	Positivi/totale analizzati	Positivi/campioni capsidici positivi	
		Capsidica	RdRp
Totale	22/79 (27,8%)	11/22 (50%)	9/22 (40,9%)

Tabella 6.5: risultati ottenuti per la ricerca del genoma di HEV mediante RT-nested PCR suddivisi per regioni genomiche amplificate. La seconda e la terza colonna riportano il numero dei campioni positivi ottenuti utilizzando coppie di primers che appaiano rispettivamente sulla MTasi (**PCR n°4/5**) e sulla RdRp virale (**PCR n°6**). La percentuale indicata in queste due ultime colonne è riferita ai campioni positivi sul totale dei campioni positivi nella RT-nPCR per la regione del capsidico. Nella tabella non sono riportati i 68 campioni collezionati durante i piani di sorveglianza per *Brachyspira spp.* e *Lawsonia intracellularis*.

Dall'analisi di 9 sequenze del frammento della capsidica è stato possibile evidenziare anche in questo caso un evidente raggruppamento geografico dei ceppi virali. Infatti nell'allevamento della Provincia di Ancona sono stati identificati tre ceppi appartenenti al sottotipo 3e aventi tra loro una percentuale di identità del 98-100% (figura 6.8). I ceppi rilevati in Provincia di Perugia appartenevano tutti al sottotipo f; anche in questo caso si possono notare dei cluster intra-allevamento, con una percentuale di identità nucleotidica tra i ceppi dei due allevamenti dell'88% (figura 6.8).

togeni enterici potrebbe aver fluidificato il contenuto intestinale portando ad una maggiore diluizione del virus eventualmente presente; la presenza di questi batteri potrebbe aver interferito con i processi di diagnostica biomolecolare, sebbene siano stati utilizzati diversi approcci; la numerosità campionaria in funzione delle dimensioni dell'allevamento non era sufficiente a garantire la stima della prevalenza. In letteratura non sono presenti studi condotti nei suini che evidenziano interazioni tra HEV e batteri patogeni mentre per quanto riguarda l'uomo sono noti pochi casi di co-infezione tra HEV e batteri, in particolare Salmonella (Deepak et al., 2009). La possibile interazione tra HEV e altri patogeni intestinali è un aspetto che merita particolare attenzione in ambito suinicolo e andrebbe approfondito.

Escludendo questi campioni, la prevalenza media è del 30,5%, simile a quella ottenuta nel corso di altri studi italiani ed europei. Nonostante il campionamento non sia significativo, la fascia di età più colpita in questi studi risulta essere quella dei suini tra i 60 e 90 giorni di età (36%, 18/50) come evidenziato in figura 6.9. Va sottolineato che solo per 254 campioni sui 343 analizzati era nota l'età degli animali da cui proveniva il campione fecale.

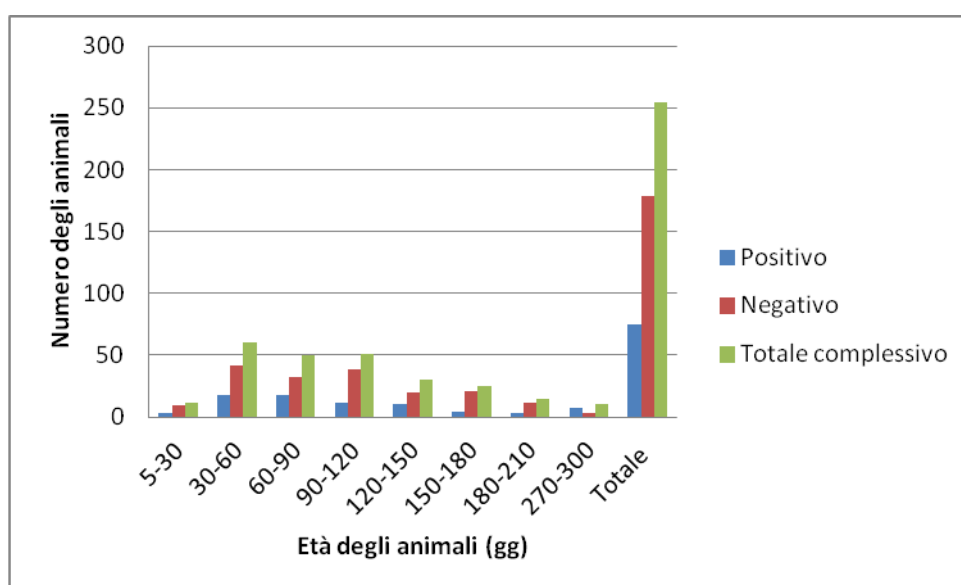


Figura 6.9: prevalenza per HEV in funzione delle diverse fasce di età esaminate durante i tre studi.

Per quanto riguarda la valutazione delle metodiche di diagnostica si è evidenziato che la sensibilità della RT-nested PCR subisce delle variazioni in funzione delle coppie di primers utilizzate. Infatti, i primers che appaiano sulla regione del capsido permettono una maggiore sensibilità rispetto a quelli che appaiano sulle altre regioni da noi esaminate. I primers che appaiano sulle regioni della MTasi e dell'RdRp confermano il risultato ottenuto rispettivamente nel 65,6% e nel 47,4% dei casi (tabella 6.6).

Anno	Capsidica-Positivi	
	Mtasi	RdRP
2011	np	40%
2012	81,25%	61,35
2013	50%	40,90%
Media	65,63%	47,41%

Tabella 6.6: percentuale dei campioni positivi per la presenza del genoma di HEV mediante RT- nested PCR nella regione capsidica (Capsidica-Positivi) riconfermati utilizzando primers che amplificano per le altre due regioni genomiche analizzate. np= non processati

Un altro recente studio (Mokhtari et al., 2013) dimostra come la sensibilità dei test diagnostici possa variare in base alla regione genomica utilizzata come target per la diagnosi biomolecolare ed in base ai sottotipi e genotipi rilevati, rendendo a volte difficile diagnosticare come positivi alcuni campioni con l'utilizzo di un solo approccio.

I primers utilizzati durante il lavoro qui presentato appaiano su tutti i genotipi di HEV e in questo caso non è stata evidenziata nessuna correlazione tra i sottotipi esaminati e la capacità di questi primers di appaiarsi e permettere l'amplificazione del DNA.

Per quanto riguarda gli animali con sintomi gastroenterici, è stata evidenziata l'elevata diffusione di HEV in Italia anche in animali molto giovani (1 mese di età). La prevalenza media osservata in questo studio è del 34,4% ed è paragonabile con quella ottenuta sia nel primo studio descritto che in lavori precedenti da noi condotti (Di Bartolo et al., 2010) su animali asintomatici (circa 40%). Studi di altri autori condotti su suini appartenenti alla medesima fascia di età riportano prevalenze simili, sia in animali sintomatici (Vascikova et al., 2009 riportano come il 37,5% dei suinetti affetti da PMWS fosse positivo per HEV) che sani (de Deus et al. (2007), rilevarono SwHEV nel 46,4% delle feci di suinetti di 1-22 settimane di età). In passato si era ipotizzato che HEV potesse agire in sinergia con altri virus (ad esempio con il *porcine circovirus type 2b*, PCV2b) nel determinismo di sindromi multifattoriali del suino (Martin et al., 2007), ma numerose infezioni sperimentali condotte non sono riuscite a riprodurre nessuna sintomatologia clinica. Recentemente, in Cina è stato identificato un focolaio in cui venne rilevata una mortalità del 100% in 300 suinetti svezzati. L'analisi di diversi campioni prelevati in sede autoptica ha messo in evidenza in uno di questi animali la co-infezione tra PRRSV e HEV genotipo 4, mentre tutti gli animali erano negativi per i principali batteri patogeni dei suini (Mao et al., 2013);

Dai risultati di questo studio emerge quindi come HEV non sembra essere associato all'insorgenza di sintomi gastroenterici nel suino. Gli stessi campioni fecali sono stati esaminati anche per la presenza di Norovirus suino, Sapovirus, Rotavirus e Kobuvirus (Di Bartolo et al., accettato da Archives of Virology). Nessuno dei campioni era positivo per NoV suino, il 20% dei feci erano positive per Sapovirus, il 51,7 % dei suini era positivo per Rotavirus mentre solo 3 campioni erano positivi per Kobuvirus.

Solo 4 dei campioni analizzati erano positivi per tutti i virus, mentre 7 lo erano per HEV, Rotavirus e SaV, 10 erano positivi solo per HEV e SaV, 17 per HEV e Rotavirus.

La presenza di infezioni miste nei suini non sorprende in quanto diversi studi (Dufkova et al., 2013; Reuter et al., 2008; Halaihel et al., 2010) dimostrano la presenza di questi virus nel contenuto intestinale anche di suini senza sintomatologia. In questo caso la diarrea potrebbe essere associata a un sinergismo di azione dei diversi virus.

E' stata inoltre rilevata una clusterizzazione geografica dei ceppi: questa osservazione è interessante, soprattutto in quanto la medesima situazione non viene invece rilevata nei casi umani (Ijaz et al., 2013). Si può supporre che la minore movimentazione degli animali rispetto agli uomini e l'introduzione di nuovi suini sempre dalla medesima fonte (ad esempio stesso allevamento fornitore di animale) favorisca la circolazione e la selezione di specifici sottotipi virali intra-aziendale. Dall'altro lato risulta difficile rintracciare le fonti di infezione nell'uomo.

Per quanto riguarda invece l'analisi dei ceppi non è stata riscontrata nessuna correlazione tra i casi umani autoctoni causati dal genotipo 3 di HEV ed i ceppi da noi sequenziati durante questi anni, sebbene in alcuni casi questi presentino tra loro elevate percentuali di identità nucleotidica, che variano dal 81% al 94% rispetto ai ceppi umani considerati (figura 6.8).

A questo proposito va però preso in considerazione che spesso vengono utilizzati diversi primers per ricercare HEV nell'uomo, e spesso le regioni sequenziate e disponibili in GenBank si sovrappongono solo parzialmente a quelle da noi ottenute. Questo suggerisce l'importanza di utilizzare per la diagnostica nel suino e nell'uomo delle coppie di primers che permettano di amplificare frammenti comuni di almeno 450-500 bp in modo da poter effettuare analisi filogenetiche maggiormente significative. Inoltre sarebbe interessante poter paragonare, se non i genomi completi, almeno più regioni genomiche dei diversi ceppi al fine di evidenziare eventuali mutazioni che possano favorire la trasmissione zoonotica del virus.

Uno dei ceppi sequenziati (SwHEVE4NA12) mostra un'elevata percentuale di identità nucleotidica con un ceppo identificato nell'uomo in Inghilterra (Ijaz et al., 2013). Nello studio citato viene associato l'aumento dei casi autoctoni di HEV all'introduzione nel Paese di un nuovo gruppo di ceppi virali, i quali hanno iniziato a circolare nella popolazione umana solo nel 2010 raggiungendo il massimo di circolazione nel 2012. Dato il sensibile aumento della casistica umana (in Inghilterra e Galles dal 2003 al 2012 si è passati da 14 a 409 casi umani causati da ceppi di HEV del genotipo 3) sembrerebbe che questo nuovo gruppo virale (corrispondente ai sottotipi c,h ed i) possa essere

maggiormente patogeno per l'uomo rispetto al precedente. Il ceppo da noi identificato è simile ad uno di questi ceppi in declino. Sebbene non sia possibile paragonare le due situazioni epidemiologiche, sarebbe interessante indagare se anche negli allevamenti italiani si noti una netta separazione tra i ceppi del passato e quelli più recenti.

Infine, recentemente è stato introdotto negli allevamenti suini europei il genotipo 4 di HEV, considerato in precedenza prettamente asiatico, nonché responsabile di forme cliniche nell'uomo più gravi. A seguito della sua prima introduzione nei suini (nel 2011 in Belgio ed Olanda, Hakze-van der Honing et al., 2011) si è assistito ad un incremento dei casi umani di epatite E soprattutto in Francia (Colson et al., 2012; Bouamra et al., 2014) tanto da definire questo genotipo emergente in Europa. Nel 2011 sono stati segnalati i primi 4 casi autoctoni di HEVg4 in Italia (Garbuglia et al., 2013) e pertanto risulta fondamentale continuare la sorveglianza di tale virus sui serbatoi animali sul territorio italiano.

6.3 Studio epidemiologico retrospettivo in tre allevamenti del Nord Italia (anno 2000)

6.3.1 Introduzione

Swine Hepatitis E Virus venne identificato nei suini per la prima nel 1997 negli USA (Meng et al., 1997); i ceppi allora analizzati furono filogeneticamente correlati a quelli di due pazienti statunitensi con epatite E, senza anamnesi di viaggio nei paesi ad alta endemicità. In Italia, il primo caso umano autoctono causato da HEV genotipo 3 è stato segnalato nel 1999 (Zanetti et al. 1999) mentre nei suini italiani è stato evidenziato solo nel 2006 (Di Bartolo et al., 2008). Si è quindi deciso di effettuare uno studio retrospettivo a partire da campioni collezionati nel 2000, ovvero un anno dopo la segnalazione del primo caso autoctono italiano, per conoscere la diffusione di SwHEV negli allevamenti del Nord Italia.

6.3.2 Materiali e metodi

Lo studio retrospettivo è stato condotto su 78 campioni di feci (63 da suini all'ingrasso e 15 da scrofe) prelevati da suini provenienti da 3 allevamenti del Nord Italia (provincia di Brescia) nel 2000. Gli animali erano tutti asintomatici. Le feci sono state conservate a -80°C. I campioni sono stati analizzati come descritto in precedenza (vedi materiali e metodi, capitolo 8).

6.3.3 Risultati

Complessivamente 15/78 animali (19,23%) sono risultati positivi per il genoma di HEV utilizzando i primers che amplificano una porzione della ORF2; di questi, 14/63 (22,2%) erano suini all’ingrasso mentre dei soggetti in riproduzione solo 1 animale su 15 era positivo (6,66%). Solo due dei tre allevamenti campionati sono risultati positivi. Analizzando i campioni con i primers che appaiano nelle altre regioni del genoma, 9 campioni sono risultati positivi per la MTase e 12 per l’RpRd. Dall’analisi di tutte le sequenze ottenute è stato confermato che i ceppi circolanti appartenevano al genotipo 3 sottotipo e. In base alla sequenze del capsido i 10 ceppi esaminati possedevano una percentuale di identità nucleotidica variabile tra il 93,6 e il 100% (figura 6.10). Se invece si comparavano le sequenze proteiche, in questo caso la variabilità aminoacidica risultava conservata e in un caso (ceppo SwHEV Em73) aumentata, variando dal 92,5% al 100% rispetto a quella nucleotidica. Di alcuni dei ceppi è stata sequenziato anche il frammento della MTasi (4 ceppi) e della RdRp (6 ceppi): le differenze inter-ceppo erano rispettivamente del 99,6% e del 98,7-100%.

Per quanto concerne il confronto con gli altri ceppi umani, questi ceppi presentavano un’identità nucleotidica del 94% con un ceppo italiano (acc. n° HM446631) e un ceppo francese (acc. n° HM055578), entrambi identificati nel 2009 (figura 6.10).

Non sembra invece essere presente un sottotipo predominante nei diversi anni esaminati.

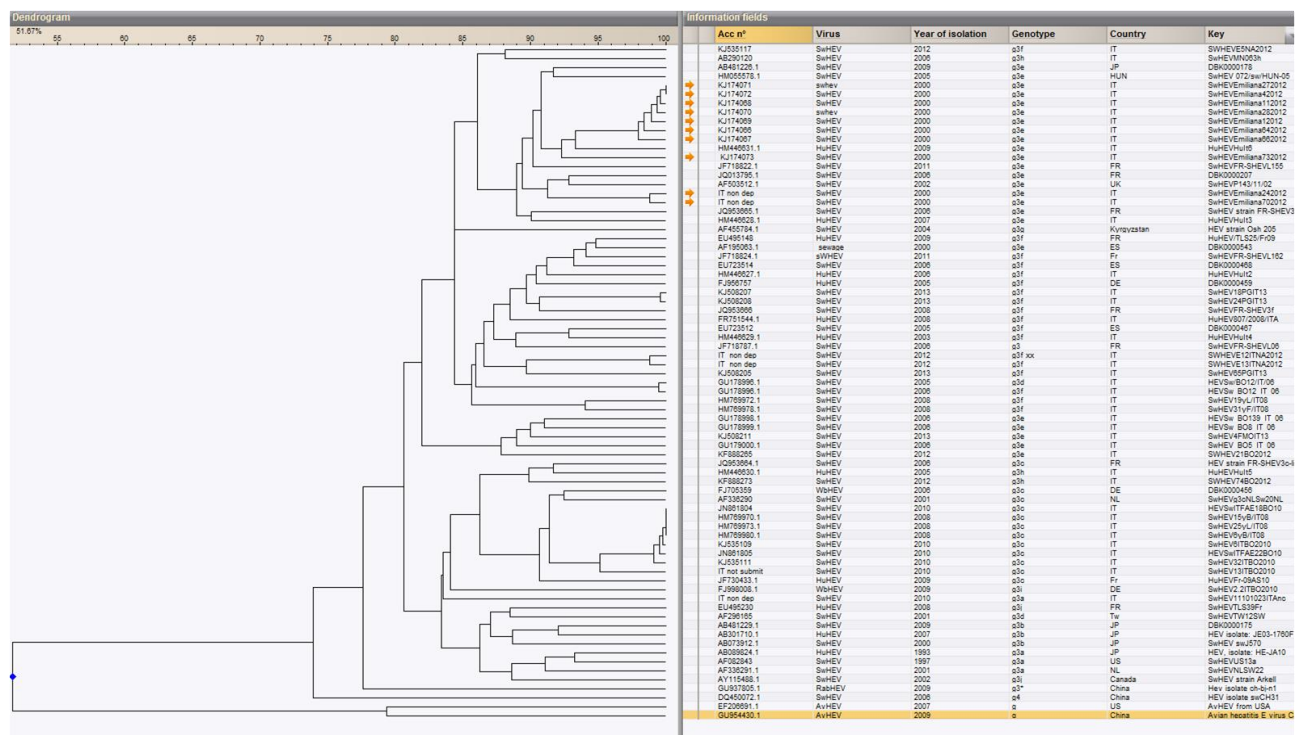


Figura 6.10 dendrogramma costruito con il metodo UPGMA di 10 frammenti della capsidica di alcuni dei ceppi sequenziati nel 2000 (indicati con una freccia), di 41 sequenze umane e suine italiane e di altri ceppi europei ed extraeuropei.

6.3.4 Discussione

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di 2 lavori che prendevano in considerazione la stessa fascia di età e la stessa regione geografica: il primo studio è quello descritto in precedenza (capitolo 6.2) e condotto nel 2010 in cui sono stati analizzati 100 campioni fecali provenienti da un allevamento all'ingrasso. Nel secondo lavoro preso in esame (Di Bartolo et al.; 2008) erano stati analizzati campioni fecali raccolti da animali all'ingrasso di diverse fasce di età e dai riproduttori di diversi allevamenti del Nord Italia nel 2006. Si sono scelti i sopracitati studi in quanto condotti tutti dallo stesso laboratorio, al fine di diminuire le differenze nella diagnosi legate alle metodiche utilizzate.

Sebbene i dati facciano riferimento a diverse tipologie di allevamento, i risultati mostrano una lieve tendenza all'aumento della prevalenza di HEV nei suini con un'età >120 giorni, passando dal 22,2% nel 2000, al 27% nel 2006 e nel 2010. Anche per quanto riguarda le scrofe si rileva un aumento della prevalenza tra il 2000 e il 2006 (6,6% vs 42.3%) (figura 6.11). In questo caso è da escludere un aumento della sensibilità diagnostica negli anni, infatti i tre studi utilizzano primers universali che appaiano sulla regione del capsido (regione molto conservata del genoma virale) nonché lo stesso kit di estrazione e kit di RT-nested PCR con simile efficienza.

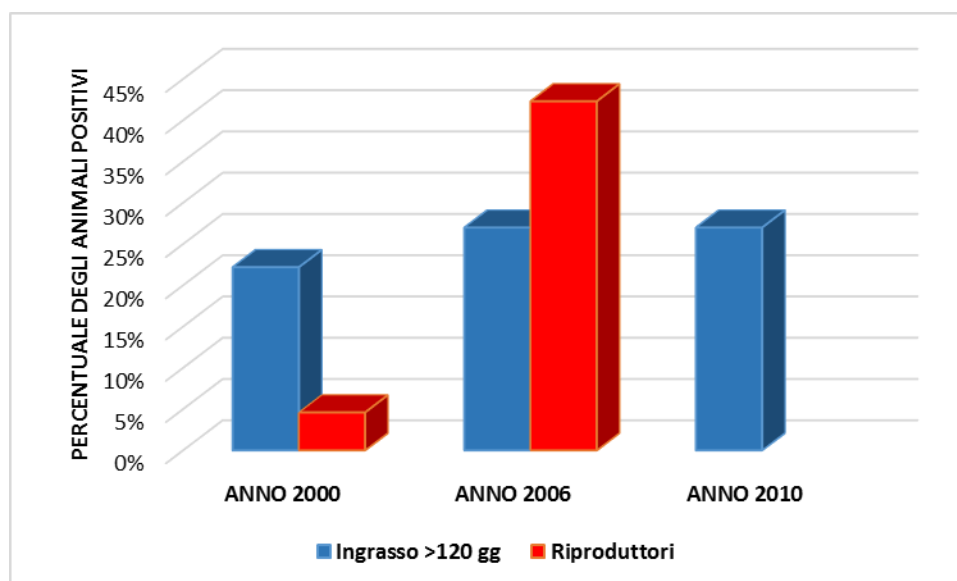


Figura 6.11: prevalenza rilevata dall'analisi di campioni collezionati nel 2000; i dati ottenuti da questo studio sono paragonati quelli ottenuti da campioni fecali campionati nel 2006 (Di Bartolo et al., 2008) e nel 2010 (capitolo 6.2).

Analizzando le sequenze ottenute si può affermare che nei 2 allevamenti positivi tutti i ceppi circolanti appartenenti al solo genotipo 3e. In questo caso non è stata notata un'evidente clusterizzazione inter-allevamento come nei precedenti studi.

Per la costruzione dell'albero sono state ricercate in BLAST le sequenze di HEV a partire dall'anno 1993 in cui è stato depositato il primo ceppo umano del genotipo 3, mentre il primo ceppo suino risale al 1997. Purtroppo dalla ricerca effettuata solo pochi ceppi depositati dal 2000 al 2006 risultano appartenere al genotipo 3, mentre questi aumentano considerevolmente da quell'anno fino ad oggi. Questo rispecchia ovviamente l'interesse crescente e il crescente numero di studi di monitoraggio di questo virus effettuati.

Per quanto riguarda l'analisi delle sequenze, confrontando i ceppi del 2000 con altri ceppi suini e umani risulta evidente come il virus sia particolarmente stabile negli anni: infatti questi ceppi presentano elevate percentuali di identità anche con ceppi identificati 9 anni dopo. Va comunque rilevato che il sottotipo e è stato evidenziato raramente dagli studi di monitoraggio di HEV negli allevamenti italiani rispetto ai sottotipi f, h e c. Si potrebbe quindi ipotizzare che nel corso degli anni alcune varianti virali si siano meglio adattate alla popolazione suina rispetto ad altre.

L'analisi di sequenze più lunghe del genoma potrebbe essere utile per capire l'evoluzione genetica dei diversi ceppi negli anni ed eventualmente riconoscere la presenza di mutazioni favorevoli alla conservazione di determinati ceppi virali rispetto ad altri.

7 Sequenziamento e caratterizzazione del genoma completo di un ceppo suino di HEV

Come riportato in letteratura e come dimostrato anche da esperienze dirette (vedi capitolo 10), ad oggi non esiste un sistema efficace di crescita *in vitro* di HEV. Pertanto, vengono utilizzati antigeni ricombinanti per la caratterizzazione antigenica dei virus ed è principalmente effettuato lo studio del genoma virale per determinare le correlazioni evolutive tra ceppi diversi.

I primers per la diagnostica mediante PCR amplificano brevi porzioni genomiche sulle quali è difficile effettuare studi filogenetici conclusivi, i quali forniscono informazioni più attendibili e significative quando sono estesi al confronto di geni interi e, laddove possibile, di interi genomi. Tuttavia, considerando che HEV ha un genoma a ssRNA, quindi facilmente degradabile, e che le possibilità di amplificare la carica virale mediante coltura *in vitro* sono estremamente scarse, lo studio del genoma virale è il più delle volte reso complesso dalla bassa concentrazione virale presente nei campioni.

Ad oggi, sono disponibili 22 genomi completi di ceppi del genotipo 3 di HEV identificati nel suino (GenBank, NCBI), ma nessuno di questi è stato identificato in Italia e solo pochi in Europa. Pertanto, uno dei ceppi di swHEV identificati durante lo studio condotto nel 2012 è stato sequenziato nell'intero genoma (SwHEV E2IT12). Lo studio filogenetico sul genoma intero ha consentito di investigare la vicinanza genetica del ceppo di origine suina in esame con altri ceppi, e in particolare le correlazioni genomiche tra i ceppi virali appartenenti al genotipo 3 che infettano i suini e quelli che infettano l'uomo, allo scopo di evidenziare possibili ceppi virali o determinanti genomici che potrebbero facilitare il passaggio del virus dagli animali all'uomo.

7.1 Materiali e Metodi

7.1.1 Sequenziamento del genoma intero mediante primer walking

La strategia utilizzata è stata quella del *primer walking*. Tale procedura prevede l'utilizzo iniziale di primer degenerati, disegnati su una sequenza *consensus*; in seguito, sulla base delle sequenze ottenute, vengono disegnati primers specifici per il ceppo analizzato (figura 7.1). In questo modo si procede "passo dopo passo" mediante cicli di PCR-sequenze sino a coprire l'intero genoma del virus.

Nel dettaglio, la sospensione fecale (10%) del ceppo SwHEV E2IT12 è stata utilizzata per l'estrazione dell'RNA totale che è stato utilizzato per la sintesi del cDNA utilizzando come stampo la coda di A presente al 3' del genoma di HEV, mediante un oligo-dT. Il genoma è stato retrotra-

scritto utilizzando il kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) come da istruzioni del produttore. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per effettuare una prima serie di PCR con primers che appaiavano su regioni conservate del genoma (indicati in tabella 7.1 come PCR 2, 5 e 6). Tutte le PCR sono state eseguite utilizzando la DNA polymerase proof reading Expand High Fidelity PCR System (Roche) secondo le istruzioni del produttore.

Mediante l'utilizzo del software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgio) è stato eseguito un allineamento tra diversi genomi completi appartenenti a ceppi del genotipo 3 ed è stata costruita una sequenza *consensus*. Su questa sono stati identificati, nelle posizioni necessarie in cui non erano presenti primers noti, delle regioni maggiormente conservate tra i diversi ceppi. Sono state poi scelte, sia "manualmente" sia mediante il software Primer3 (www.bioinfo.ut.ee/primer3), le sequenze dei nuovi primers, lunghe circa 20 bp e contenenti un adeguato rapporto tra i nucleotidi CG/AT, per ottenere una temperatura di melting dei primers di circa 55-60°C (vedi tabella 7.1).

Primer utilizzati durante il sequenziamento dell'intero genoma di un ceppo di SwHEV					
PCR n°	Nome primer	Sequenza del primer	Frammento amplificato (bp)	Regione amplificata	Riferimento bibliografico
8	HEV ATG ORF1 NEW	ccatggaggcccatcagttc	423	Metiltrasferasi	* Primer Forward che appaia sull'ATG della <i>ORF1</i> .
	HEVORF1con-a1 Rw	ccatcrarrcagtaagtgcggtc			Erker at al., 1999
	HEV ATG ORF1 NEW Fw*	ccatggaggcccatcagttc	340		* Primer Forward che appaia sull'ATG della <i>ORF1</i> .
	HEVORF1con-a2 Rw	ggcagwrtaccarcgctgaacatc			Erker at al., 1999
9	HEVORF1con-s1 Fw	ctggcatyactactgcyattgagc	1820	Metiltrasferasi,Dominio Y e PCP	Erker at al., 1999
	HEV1844 Rw	ggrgtkagctcatawgtgaggc			* Primer Reverse che appaia 1844 bp a monte dell'atg della <i>ORF 1</i> .
	HEVORF1con-s2 Fw	ctgccytkgcgaatgctgtgg	1470		Erker at al., 1999
	HEV1547Rw	ggaagcaagtgcactcctgc			** Primer Reverse che appaia 1547 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .

PCR n°	Nome primer	Sequenza del primer	Frammento amplificato (bo)	Regione amplificata	Riferimento bibliografico
10	SWHEV 1395 FW	gatgagcgggtcccytgccg	1498	PCP, Dominio X ed Eli- casi	** Primer Forward che appaia 1395 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	SWHEV 2893 RW	gtycgygcdgtytcrttcag			* Primer Reverse che appaia 2893 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	1457fw	ggcaggagtgcacttgcttcc	1363		** Primer Forward che appaia 1547 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	HEV2820RW	ggcttattagcctcaaaccacgc			* Primer Reverse che appaia 2820 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
11	2744fw	cctgggagcgtaaccatcg	1832	Elicasi e RdRp	** Primer Forward che appaia 2744 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	EAP 4576	agggtgccgggctcgccgga			Zhai et al., 2006
	2744fw	cctgggagcgtaaccatcg	1817		* Primer Forward che appaia 2744 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	IAP4561	tcaccggagtgyttcttcagaa			Zhai et al., 2006

PCR n°	Nome primer	Sequenza del primer	Frammento amplificato (bp)	Regione amplificata	Riferimento bibliografico
12	SWHEV 4082FW	gargcyaggtkgagaaggg	1360	RdRp	* Primer Forward che appaia 4082 bp a monte dell'atg della <i>ORF1</i> .
	HEVORF2/3CON-A1	aggggttggttggaataggg			Erker at al., 1999
	SWHEV 4082FW	gargcyaggtkgagaaggg	1248		* Primer Forward che appaia 4082 bp a monte dell'ATG della <i>ORF2</i> .
	HEVORF2/3CON-a2	akkgcgaagggtgagaatcaacc			Erker at al., 1999
13	ESP Fw	cgagggttgacaaatgttgcg	950	RdRp e Capsidica	Kabrane-Lazizi et al., 2001
	R2	gggctgaacaaaatcctgacatc			Kasorndorkbua et al., 2005
	ISP Fw	ccgtgtttatggagttagccc	906		Kabrane-Lazizi et al., 2001
	R2	gggctgaacaaaatcctgacatc			Kasorndorkbua et al., 2005
14	HEVint5	gctcgccctcgacagcc	1754	Capsidica	Primer forward disegnato nel nostro laboratorio su ceppi suini italiani; appaia sull'atg della <i>ORF2</i> .
	TAA_RWg3F	aagactccckggtcttacctacc			* Primer Reverse che appaia sul TAA della <i>ORF2</i> .

Tabella 7.1: primers utilizzati per amplificare i frammenti di SwHEV ed ottenere il genoma completo del ceppo in esame. Dove non viene riportata la referenza si tratta di primer disegnati in questo lavoro, se indicati con * i primer sono stati disegnati su una sequenza *consensus* costruita con ceppi suini italiani e non, di genotipo 3; se indicati con ** i primers sono stati disegnati sul ceppo in esame.

7.1.2 Clonaggio e Sequenziamento dei frammenti di DNA

I frammenti di genoma di lunghezza superiore a 1000 bp sono stati ligati e clonati nel plasmide commerciale pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) seguendo le istruzioni del produttore.

I plasmidi ottenuti sono stati trasformati nelle cellule competenti di *E. coli* JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega), secondo le istruzioni fornite dal produttore e sono stati isolati i cloni positivi. Si è scelto di sottoporre a sequenziamento almeno tre cloni di uno stesso vettore ricombinante, così da confermare l'eventuale presenza di mutazioni. Tutti i frammenti sono stati sequenziati nelle due direzioni utilizzando i rispettivi primer sense ed antisense.

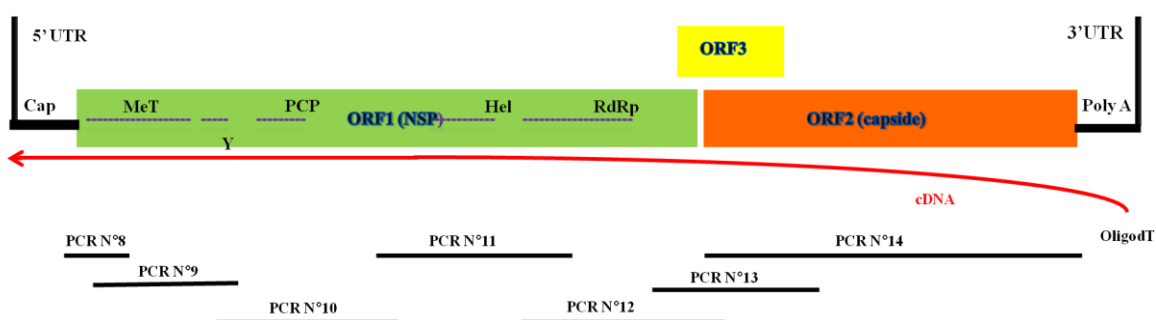


Figura 7.1: frammenti sequenziati per ottenere il genoma completo del ceppo SwHEV E2IT12. I numeri riportati sopra ogni frammento indicano le PCR effettuate come indicato nella tabella 7.1.

Le sequenze ottenute sono state assemblate utilizzando il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) mediante *contig assembling* ottenendo un frammento di 7143 bp. Con lo stesso software sono stati costruiti tutti gli alberi filogenetici (dendrogramma mediante metodo UPGMA, alberi mediante maximum parsimony).

7.2 Risultati

Il genoma completo del ceppo italiano di HEV è stato confrontato con quello di 20 ceppi umani (appartenenti ai genotipi 1, 2, 3, 4), 23 ceppi suini (genotipi 3 e 4) e 12 ceppi identificati in diverse specie animali (cinghiale, coniglio, avicoli, furetto e ratto) (figura 7.2 e 7.3). I dettagli sull'origine dei ceppi sono riportati in fig. 7.3.

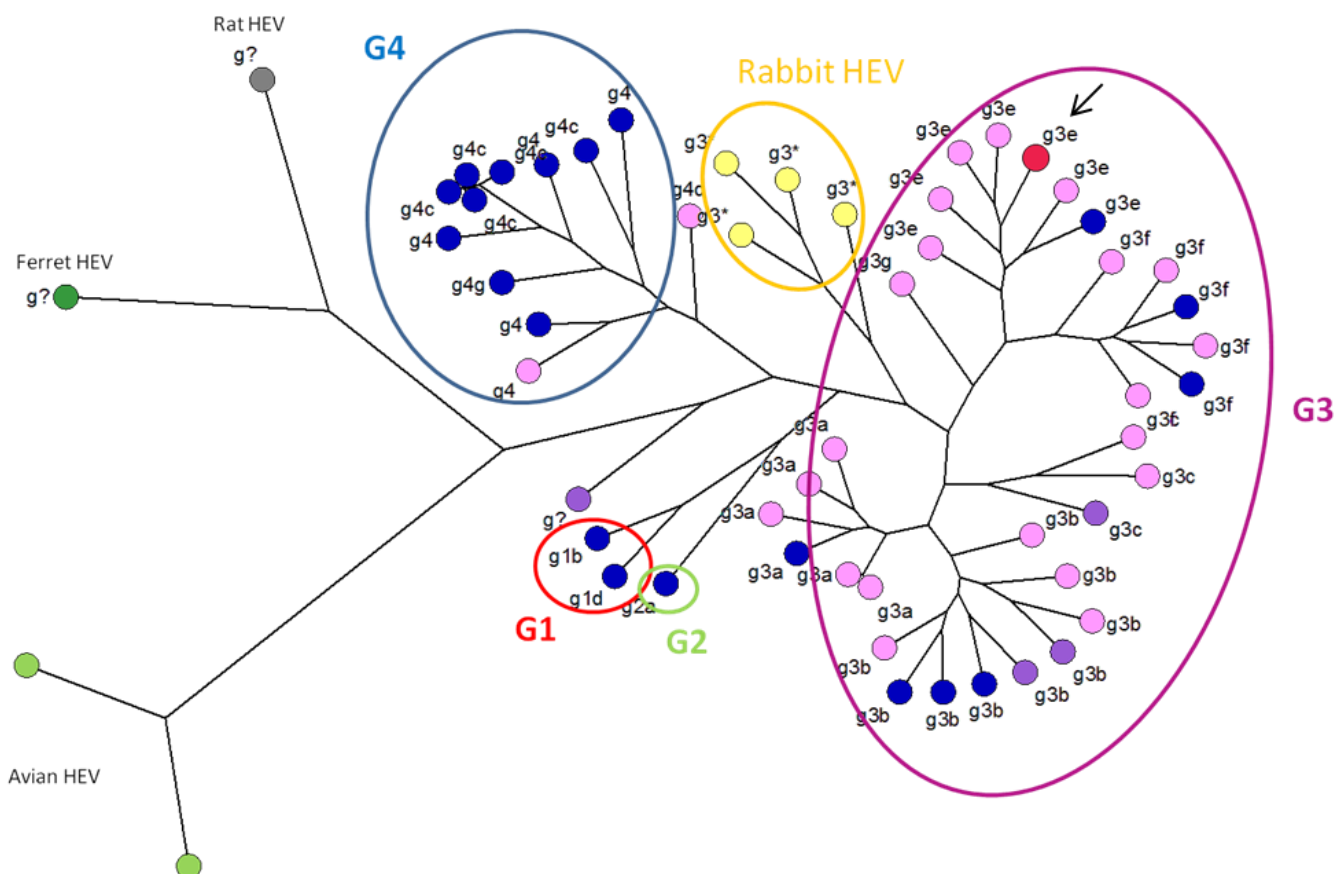


Figura 7.2: Albero filogenetico (*Basic maximum parsimony*) in cui sono confrontati i genomi interi del ceppo italiano di HEV oggetto di questo studio (in magenta), con quello di altri ceppi suini (in rosa), di cinghiale (in viola), umani (in blu), del coniglio (in giallo), aviari (verde chiaro), del furetto (verde scuro) e del ratto (in grigio).

Acc n°	Host	Genotype	Country	Year of isolation
GU345042.1	Rat	q?	DE	2009
JN998607.1	Ferret	q?	Netherlands	2010
EF206691.1	avian	avian	US	2007
GU954430.1	Avian	avian	China	2009
D10330	Human	q1b	JP	1989
AY230202.1	Human	q1d	Marocco	1994
M74506.1	Human	q2a	Mexico	1992
JX565469	Rabbit	q3*	VIRGINIA USA	2010
FJ906895.1	Rabbit	q3*	China	2009
GU937805.1	Rabbit	q3*	China	2009
IQ013791	Rabbit	q3*	France	2007
AB443623	Swine	q3b	JP	2002
JQ953664.1	Swine	q3c	FR	2006
FJ705359	Wild boar	q3c	DE	2006
AB236320.1	Human	q3b	JP	2002
AB073912.1	Swine	q3b	JP	2000
AB301710.1	Human	q3b	JP	2007
AF455784.1	Swine	q3q	Kyrgyzstan	2004
AB222184.1	Wild boar	q3b	JP	2005
AY575857.1	Swine	q3a	US	1996
AF082843 AF011921	Swine	q3a	US	1996
AB089824.1	Human	q3a	JP	1993
AP003430.1	Human	q3b	JP	2001
AB481229.1	Swine	q3b	JP	2009
AB189070.1	Wild boar	q3b	JP	2004
AB481228.1	Swine	q3a	JP	2009
AB290312.1	Swine	q3c	Monqolia	2006
FJ956757	Human	q3f	DE	2005
EU723514	Swine	q3f	ES	2006
EU495148	Human	q3f	FR	2009
EU375463	Swine	q3f	Thai	2006
EU723512	Swine	q3f	ES	2005
JQ953666	Swine	q3f	FR	2008
AB481226.1	Human	q3e	JP	2009
AB248522	Swine	q3e	JP	2004
JQ013795.1	Swine	q3e	FR	2006
JQ953665.1	Swine	q3e	FR	2006
AB248520.1	Human	q3e	JP	2006
HM055578.1	Swine	q3e	HUN	2005
Swine HEV E2 IT	Swine	q3e	IT	2012
JQ026407.1	Monkey	q3e	JP	2009
FJ527832	Swine	q3b	China	2007
AF060668 AF035436	Swine	q3a	US	1995
FJ426404	Swine	q3a	Korea	2007
AB099347.1	Human	q4c	JP	2002
AB193177.1	Human	q4c	JP	2001
AB080575.1	Human	q4c	JP	2000
AB193176.1	Human	q4c	JP	2003
AB197674.1	Human	q4c	China	2001
AB220974.1	Human	q4q	JP	2005
AB074915.3	Human	q4	JP	1994
HM439284.1	Human	q4	China	2008
AB220979.1	Human	q4	JP	2005
EU676172.2	Swine	q4d	China	2008
DQ450072.1	Swine	q4	China	2006
AJ272108.1	Human	q4	China	2000
AB602441	Wild boar	q?	JP	2011

Figura 7.3: elenco dei ceppi utilizzati per costruire l'albero filogenetico con i relativi numeri di accesso del database NCBI, la specie ospite, il sottotipo, il Paese in cui è stato identificato il ceppo e in quale anno.

Dall'allineamento del genoma completo del ceppo italiano (in figura 7.2 indicato con la freccia) con altri genomi sia umani che animali è emerso che il ceppo in esame appartiene al genotipo 3 sottotipo e. Questo ceppo era già stato analizzato in precedenza in base ad una sequenza di 450 nucleotidi ed era risultato appartenere al sottotipo 3f. Questo risultato dimostra come sia difficile e in alcuni casi poco attendibile la sottotipizzazione di HEV se effettuata con sequenze del genoma virale troppo corte, soprattutto in casi come questo, in cui i ceppi appartengono a sottotipi filogeneticamente molto vicini.

In base alla sequenza nucleotidica, il ceppo italiano presenta un'identità tra il 98,7% e il 99,3% con altri ceppi suini dello stesso sottotipo identificati sia in Europa che in Paesi extraeuropei (ad es. in Giappone). L'identità si abbassa fino all'85% con ceppi di sottotipo f e all'83 % con il sottotipo 3g, sottotipo raro identificato in Kazakistan (vedi figura 7.2).

In un cluster separato sono presenti i sottotipi a, b, e c con cui sia il ceppo SwHEV E2IT12 che gli altri sottotipi ad esso correlati (f, e, g) mostrano un'identità dell'81,23%. Infine l'identità nucleotidica minore è riscontrata con i genotipi 3 identificati nel coniglio, nei confronti dei quali il ceppo italiano ha un'identità del 78,79% (vedi figura 7.2).

Dall'allineamento delle sole sequenze nucleotidiche della regione capsidica (1980 nt), l'analisi filogenetica appariva conservata e produceva risultati simili all'analisi del genoma completo, identificando gli stessi sottotipi per i diversi ceppi virali (figura 7.4). Il ceppo italiano mostrava una percentuale di identità nucleotidica variabile tra il 96 e il 99,9% con altre sequenze del capsido di altri ceppi suini e umani di genotipo 3. Quindi i livelli di identità nucleotidica rilevati confrontando l'intero genoma o la sola regione capsidica restano quasi invariati.

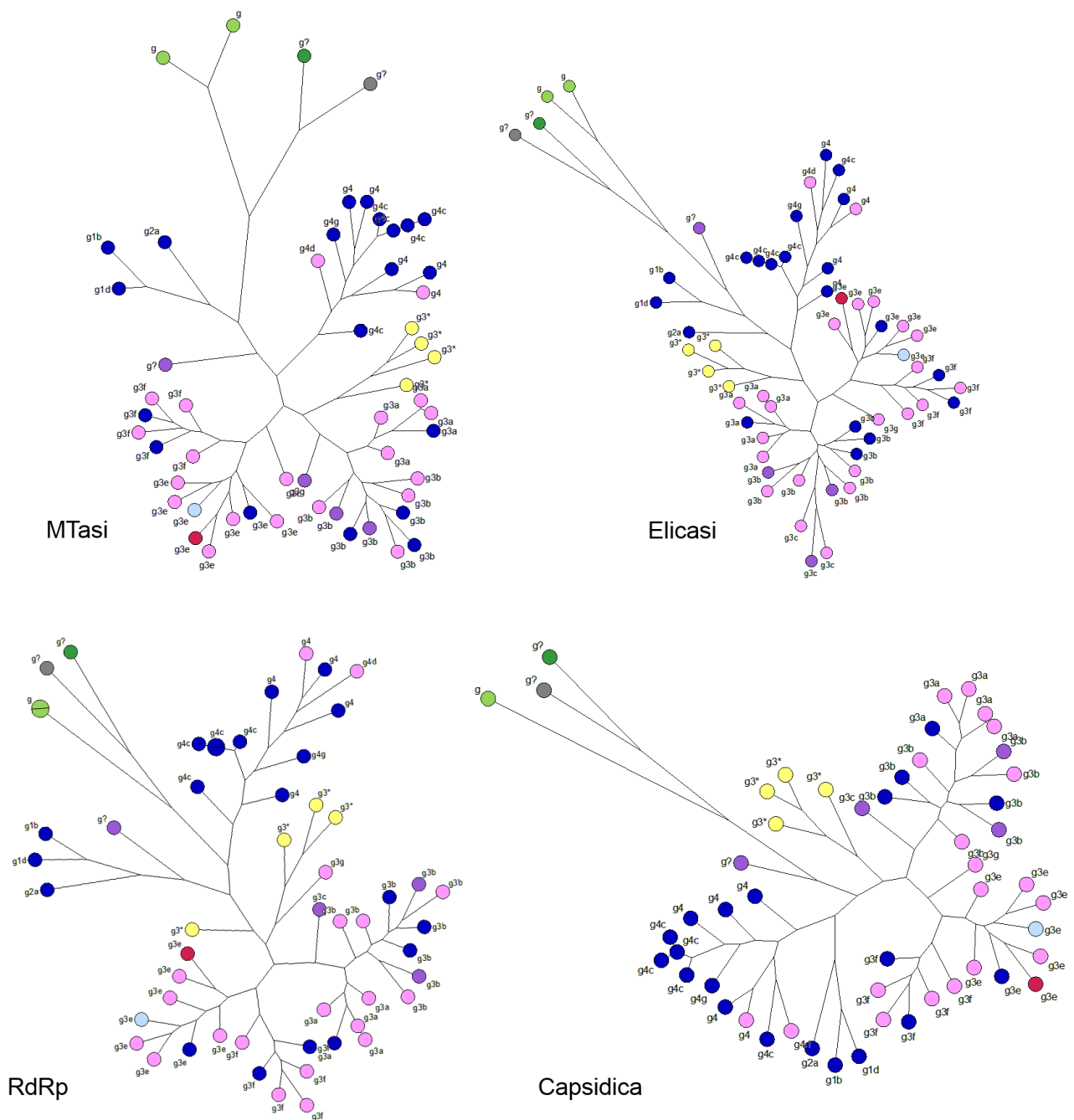


Figura 7.4: Basic maximum parsimony tree costruiti utilizzando le sequenze nucleotidiche della regioni codificanti rispettivamente per la MTasi, l'elicasi, l'RdRp (ORF1) e per la proteina capsidica (ORF2). Il ceppo italiano è colorato in magenta, in rosa gli altri ceppi suini, in viola di cinghiale, in blu quelli umani, in giallo del coniglio, in verde chiaro i ceppi aviari, in verde scuro il ceppo identificato nel furetto, in grigio quello del ratto, in celeste il ceppo identificato nella scimmia.

Sono state poi prese in considerazioni altre regioni del genoma, e nello specifico sono state considerate tre regioni codificanti per 3 proteine non strutturali: la MTasi (da 102 a 1005 nt), l'elicasi (da 2931 a 3588 nt) e l'RdRp (da 4227 a 4704nt). L'analisi di queste tre regioni ha confermato quanto già evidenziato dall'analisi della regione del capsido; pertanto a livello nucleotidico la sud-

divisione nei diversi sottotipi rimane conservata indipendentemente dalle regioni genomiche analizzate (figura 7.4).

Se invece vengono allineate le sequenze aminoacidiche della proteina del capsido si nota come la differenza tra i sottotipi diminuisca, e come la percentuale di identità oscilli tra il 96% (con tutti i ceppi di genotipo 3 a prescindere dal sottotipo ed escludendo i ceppi di coniglio, che sono separati dagli altri) e il 98% con altri ceppi di suino di sottotipo e (figura 7.5).

I risultati confermano comunque che la suddivisione nei diversi genotipi rimane ovviamente invariata.

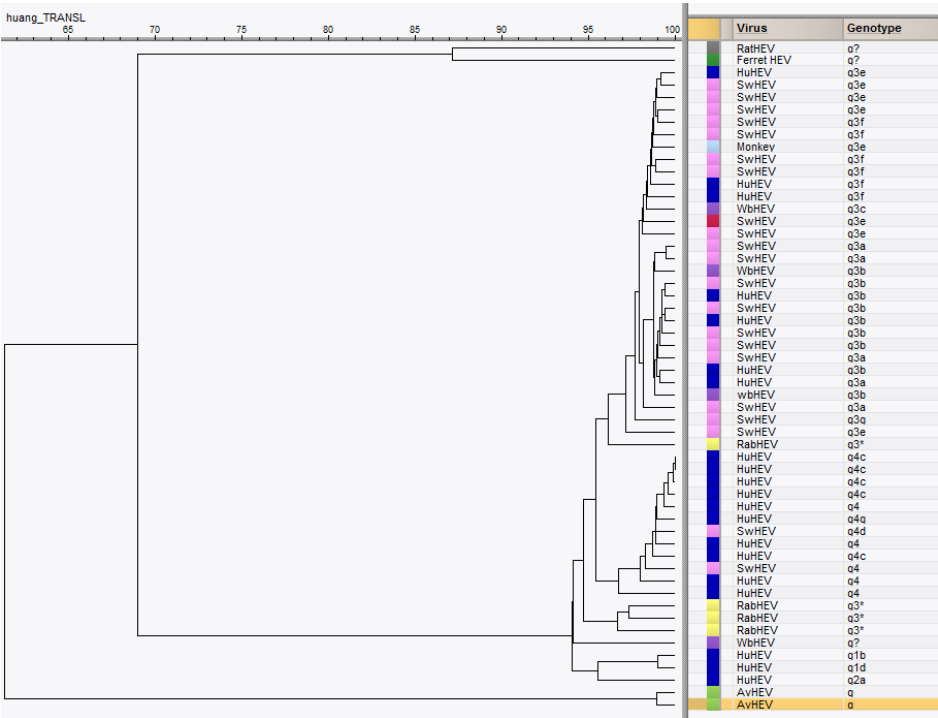


Figura 7.5: Dendrogramma costruito allineando le sequenze aminoacidiche della proteina capsidica (ORF2). In alto è riportata la scala delle percentuali di identità. I colori sono gli stessi indicati in figura 7.3.

Abbiamo poi confrontato le sequenze aminoacidiche delle regioni codificanti per la proteina RdRp e per l’elicasi, proteine non strutturali che derivano dalla maturazione post-traduzionale della poliproteina ORF1 (Ropp et al., 2000).

L’analisi condotta ha evidenziato che tra i vari genotipi i range d’identità aminoacidica restano invariati a prescindere dalle proteine esaminate, siano esse non strutturali o strutturali (proteina del capsido).

In dettaglio, il ceppo SwHEV E2IT12, appartenente al sottotipo g3e, presenta con altri ceppi dello stesso sottotipo identità aminoacidiche del 99,25, 98%, a 96%, considerando rispettivamente l’elicasi, la proteina capsidica e la RdRp.

Se lo stesso confronto viene fatto rispetto agli altri sottotipi del genotipo 3 la percentuale diventa del 96% a prescindere dalla proteina oggetto di confronto. Le percentuali scendono al 94,3-95,3% se il confronto viene fatto tra il genotipo 3e e il genotipo 4.

La percentuale di identità aminoacidica rimane intorno al 94% anche se le sequenze aminoacidiche dell’elicasi e della proteina del capsido vengono confrontate con quelle dei genotipi 1 e 2.

Solo confrontando la sequenza della RdRp di SwHEV E2IT12 con i genotipi g1 e/o g2 la percentuale scende al 91% (figura 7.6)

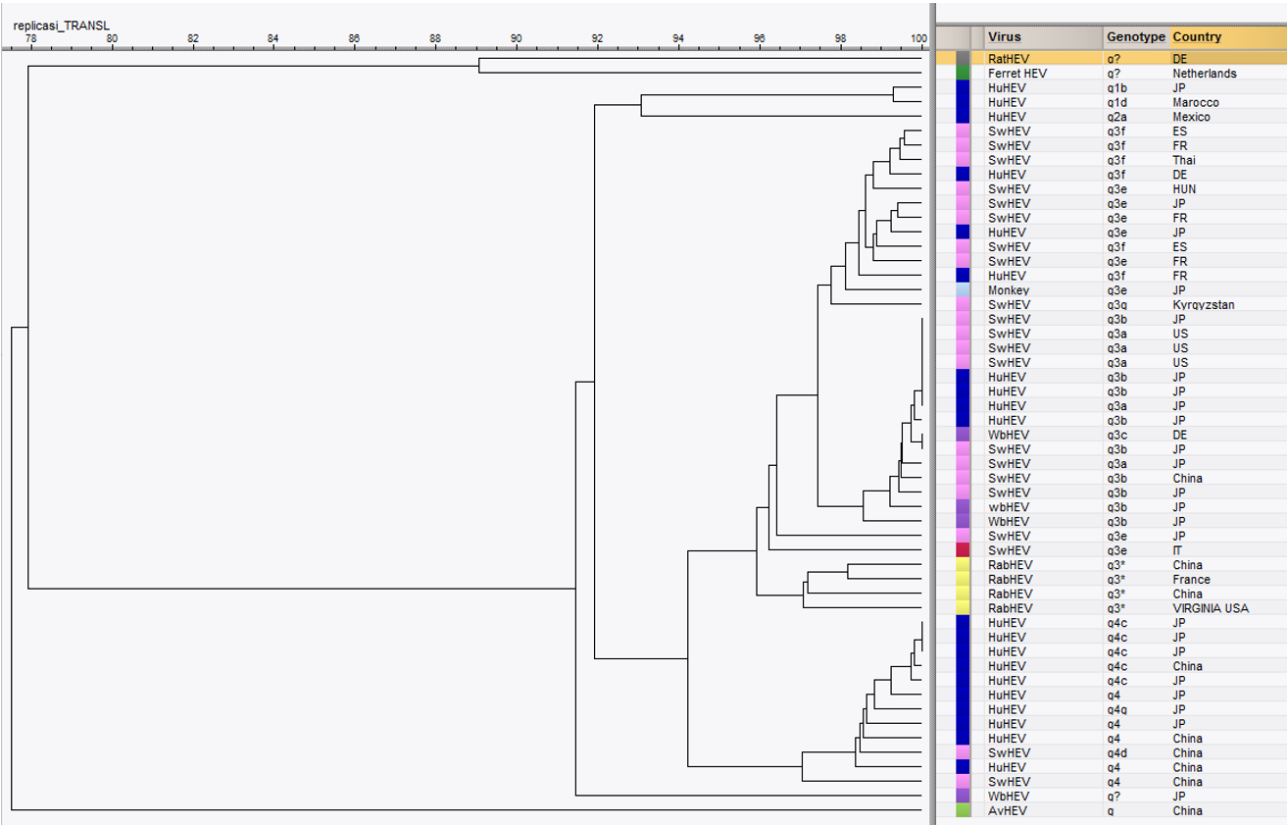


Figura 7.6: Dendrogramma costruito allineando le sequenze aminoacidiche della RdRp, 459 aa (ORF1). In alto è riportata la scala delle percentuali di identità. I colori sono gli stessi indicati in figura 7.3.

7.3 Discussione

In questo lavoro è stato ottenuto il primo genoma completo di un ceppo suino di HEV italiano. L’analisi di sequenza ha rivelato che si trattava di un ceppo di genotipo 3 sottotipo e, vicino a ceppi suini identificati sia in Europa che in Paesi extra-europei.

E' stato analizzato il genoma sia a livello nucleotidico che amminoacidico, sia nella sua interezza sia considerando le proteine strutturali e non.

I risultati dimostrano come la maggior parte delle mutazioni nucleotidiche che avvengono durante la replicazione si traducano in mutazioni silenti, ovvero mutazioni amminoacidiche che non determinano nessun cambiamento della sequenze delle proteine. Essendo HEV un virus a RNA, non sorprende che il tasso di mutazioni nucleotidiche sia elevato; infatti in questi virus la mancanza di una attività di proof-reading nell'enzima RNA replicasi induce ad una maggiore quantità di "mutazioni" durante la replicazione virale.

Sorprende invece osservare un elevato livello di identità amminoacidica, sia nella proteina strutturale che in quelle determinanti per la replicazione nell'ospite. Questo risulta molto interessante soprattutto considerando che i diversi genotipi hanno una specificità d'ospite: infatti i ceppi appartenenti ai genotipi 1/2 e 3/4 hanno delle caratteristiche epidemiologiche molto diverse e spettri d'ospite diversi. I primi due genotipi (1 e 2) infettano esclusivamente l'uomo mentre i ceppi appartenenti ai genotipi 3 e 4 infettano sia gli animali che l'uomo. Inoltre, sempre riferendosi ai genotipi 3 e 4, essi provocano nelle diverse specie effetti molto diversi, determinando nell'uomo epatiti acute e negli animali delle forme asintomatiche. Data la mancanza di modelli sperimentali efficienti e l'impossibilità di coltivare efficacemente *in vitro* questo virus è difficile stabilire quali siano i fattori che favoriscono l'infezione umana con ceppi suini, o comprendere su quali basi genetiche i ceppi suini, che non inducono sintomatologia in questa specie, sono invece responsabili di forme cliniche nell'uomo. Uno studio di questo tipo è stato effettuato per valutare se ci fossero delle mutazioni conservate in 8 ceppi di HEV appartenenti al genotipo 3 e responsabili di casi gravi di malattia nell'uomo. Il genoma di questi ceppi è stato confrontato con quello di ceppi di origine umana e suina identificando una mutazione conservata in tutti i ceppi maggiormente virulenti (Takahashi et al., 2009) all'interno dell'elicasi.

I risultati da noi ottenuti (dati non riportati) escludono la presenza di questa mutazione nel ceppo SwHEV E2IT12 esaminato.

Tuttavia, all'interno del sottotipo g3e tra le varie mutazioni amminoacidiche rilevate, c'è una serina in posizione 110 che risulta presente anche in due ceppi identici identificati mediante ricerca in BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): i ceppi in questione sono stati identificati da un caso umano giapponese e da un suino ungherese, nello stesso anno. La presenza di una serina in posizione 110 potrebbe rappresentare un'altra mutazione provoca coinvolta nell'aumento della virulenza del ceppo. L'assenza di questa mutazione nel ceppo suino di origine italiana da noi esaminato e in altri ceppi suini dello stesso sottotipo potrebbe giustificare l'assenza di casi umani collegabili a questo ceppo specifico. Evidentemente si tratta solo di un'ipotesi che potrebbe essere verificata realizzando infezioni sperimentali. In alternativa, oggi la risposta potrebbe venire dall'analisi di un numero maggiore di sequenze, considerando che quelle attualmente disponibili per questa specifica regione genomica sono piuttosto limitate. Questo esempio conferma l'importanza di sequenziare grandi porzioni del genoma virale.

Infine lo studio effettuato dimostra come la distinzione in sottotipi di HEV, come suggerita da Lu et al. (2006), possa essere messa in discussione; infatti, alcuni sottotipi presentano tra loro vicinanze elevate tali da non essere distinti, come ad esempio avviene tra il sottotipo 3e ed f, dato rilevato sia in questo studio sia in altri (Oliveira Filho et al., 2013). Inoltre, spesso la distinzione in sottotipi, basata sulle sequenze nucleotidiche, non corrisponde a un'effettiva diversità delle sequenze amminoacidiche dei ceppi virali. Pertanto, come suggerito da diversi autori (Oliveira- Filho et al., 2013, Smith et al., 2013) la classificazione di HEV andrebbe revisionata e andrebbe collegato un significato biologico all'effettiva esistenza dei sottotipi, ad oggi solo corrispondente a diversità nucleotidiche.

8 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nella filiera di produzione del suino

Data l'ampia prevalenza di HEV rilevata negli allevamenti suinicoli italiani e considerata la possibilità di trasmissione zoonotica di questo virus è stata indagata la possibile presenza del virus lungo la filiera di produzione delle carni di suino, dal macello al punto di vendita. Numerosi studi disponibili in letteratura dimostrano come HEV sia presente sia negli animali all'età di macellazione (Di Bartolo et al., 2008) che nei prodotti di origine suina destinati al consumo umano, specialmente nei fegati. Indagini condotte su fegati acquistati direttamente in macelleria, in Olanda e in Germania, hanno evidenziato la presenza di HEV rispettivamente nel 6,5% e nel 4% degli organi esaminati (Bouwknegt et al., 2007, Wenzel et al., 2011). Questa evidenza desta serie preoccupazioni in merito alla possibilità che il virus possa infettare l'uomo mediante il consumo di fegato non sottoposto ad un adeguata cottura oppure in seguito a contaminazioni crociate delle carcasse durante le procedure di macellazione o di altri alimenti durante le fasi di manipolazione anche domestiche.

A fronte di un'elevata prevalenza dell'infezione da HEV nei suini (fatto che conferma il ruolo di questa specie come serbatoio del virus), il numero di casi nell'uomo causati dal genotipo 3 rimane relativamente basso. Queste osservazioni suggeriscono alcune ipotesi: HEV potrebbe avere una trasmissione inefficiente dal suino all'uomo (sia per via diretta sia attraverso la manipolazione e il consumo di prodotti carnei), oppure i ceppi normalmente circolanti nei suini sono poco patogeni per l'uomo se confrontati con quelli appartenenti al genotipo 1. Tuttavia, si ritiene che la reale prevalenza di infezione da HEV nell'uomo sia sottostimata, in quanto spesso asintomatica o associata ad una sintomatologia simil-influenzale, e che quindi venga raramente diagnosticata con certezza. Inoltre alcuni autori (Mansuy et al., 2011) suggeriscono che il limitato numero di casi e le basse sieroprevalenze rilevate nell'uomo da alcuni studi siano dovute a una bassa sensibilità dei test diagnostici utilizzati.

In letteratura sono presenti pochi studi relativi al rischio di trasmissione alimentare di HEV (Colson et al., 2010, Lewis et al., 2010; Wichmann et al., 2008) e pertanto risulta difficile effettuare delle valutazioni del rischio di infezione mediante l'ingestione di alimenti di origine suina. Un recente comunicato dell'European Food Safety Authority (EFSA) ha sottolineato la necessità di effettuare ricerche in grado di chiarire la circolazione di HEV, dall'allevamento fino al punto di vendita, al fine di individuare eventuali punti critici nella filiera. In questo contesto, nel periodo 2010 - 2012 è stato effettuato uno studio per stimare la presenza di HEV nella filiera di produzione suina in Italia. Lo studio faceva parte del progetto europeo FP7 VITAL (Integrated Monitoring and Control of Foodborne Viruses in European Food Supply Chains) nel corso del quale la prevalenza di HEV è stata investigata in diversi Paesi Europei seguendo lo stesso approccio diagnostico e procedure standardizzare di analisi.

I risultati ottenuti in Italia, Spagna e Repubblica Ceca sono stati pubblicati nell'articolo "Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknecht M, Rodríguez-Lázaro D, Pavlik I, Ruggeri FM. Emerg Infect Dis. 2012 "

8.1 Materiali e metodi

8.1.1 Campionamento

I siti di campionamenti sono stati scelti sulla base di un questionario precedentemente condotto con lo scopo di individuare degli eventuali punti critici presenti durante macellazione. Le informazioni ottenute sono state analizzate da esperti in sicurezza alimentare e analisi del rischio coinvolti nel progetto VITAL.

Presso un macello del nord Italia sono stati prelevati campioni di feci, fegato e tessuto muscolare (della regione retrolinguale) da 34 suini clinicamente sani di circa 9 mesi di vita, provenienti tutti dallo stesso allevamento. Seguendo la filiera di produzione sono stati in seguito prelevati 52 campioni di macinato di carne per salsiccia in un sito di lavorazione delle carni; contestualmente sono stati effettuati dei tamponi ambientali dalle troclee per la macinazione (n°11) e dalle mani degli addetti alla lavorazione (n°3). Infine, l'ultima fase di campionamento si è svolta alcune settimane dopo presso il punto vendita, un supermercato, in cui sono state acquistate 77 salsicce confezionate destinate alla vendita e prodotte dallo stesso impianto di lavorazione carni campionato in precedenza. Nello stesso sito sono stati effettuati ulteriori (n°6) tamponi ambientali dai bagni dei lavoratori (maniglie, rubinetti, WC). La scelta di esaminare insaccati crudi (salsicce) è dovuta al fatto che, essendo un prodotto lavorato, può andare incontro più facilmente a contaminazioni crociate. Inoltre, vista l'abitudine alimentare diffusa in alcune regioni italiane di consumare le salsicce crude o poco cotte, queste possono essere considerate un alimento a maggior rischio.

8.1.2 Preparazione del campione ed estrazione dell'acido nucleico

➤ Controllo di estrazione

Ogni campione analizzato in questo studio è stato contaminato prima della fase di estrazione con Norovirus Murino (MNV-1), un virus ad RNA come HEV ma capace di replicare *in vitro*. MNV-1 è stato propagato su cellule RAW e sono stati preparati singoli stock virali alla concentrazione di 4×10^7 PFU/ml. La presenza di MNV-1 nei campioni analizzati, specialmente in matrici complesse come il muscolo o la salsiccia, è stata utilizzata come controllo del processo di estrazione. Infatti,

solo i campioni che risultavano positivi per MNV-1 venivano in seguito analizzati per la presenza degli altri virus (vedi figura 8.1)

➤ *Campioni fecali*

Le feci sono state collezionate dall'ampolla rettale. Duecento cinquanta mg di feci sono state rissese in 2,25 ml di PBS sterile contenente 10mg/ml di gentamicina, vortexate per 1 minuto e centrifugate a 4°C a 3000 g per 15 minuti. Il supernatante così ottenuto è stato utilizzato immediatamente per l'estrazione dell'RNA virale o conservato a -70°C fino al suo utilizzo. Alla sospensione fecale sono stati aggiunti 10 µl della sospensione titolata di Norovirus murino (MNV-1). L'RNA è stato estratto da 170 µl di sospensione fecale utilizzando il QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) secondo le istruzioni del produttore; l'acido nucleico è stato eluito in 100 µl di acqua deionizzata RNasi-free sterile e conservato a -70°C fino al suo utilizzo.

➤ *Fegato, muscolo e salsiccia*

Porzioni di circa 1 cm³ di fegato e muscolo o 5 gr salsiccia sono stati prelevati rispettivamente da diversi punti della carcassa o da diversi punti della catena di produzione e collezionati in sacchetti di plastica sterile. Il campione è stato analizzato seguendo il metodo proposto da Bouwknegt et al. (2007): in breve, 250 mg di campione sono stati omogenati meccanicamente (utilizzando una sfera di acciaio e il Tissue Lyser- QIAGEN) con 1 ml di Buffer RLT (RNeasy Midi Kit- QIAGEN) contenente β-mercaptoetanol. L'estrazione è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore e l'RNA è stato eluito in 300 µl di acqua deionizzata RNasi-free sterile e conservato a -70°C fino al suo utilizzo. Anche in questo caso tutti i campioni sono stati contaminati con 10 µl della sospensione titolata di MNV-1.

➤ *Tamponi ambientali*

Ciascun tampone è stato ottenuto utilizzando una garza sterile delle dimensioni di 10 x10 cm; questa è stata in seguito immersa in un sacchetto di plastica sterile contenente 5 ml di PBS e gentamicina (10mg/ml). In questo modo il materiale raccolto e presente nel tampone viene trasferito nel liquido con cui viene posto a contatto. Questo è stato in seguito prelevato e centrifugato a 3000 g x 5 minuti. Il chiarificato è stato addizionato del virus di controllo (10 µl della sospensione titolata di MNV-1) ed estratto utilizzando il kit NucliSENS® miniMAG® kit (bioMérieux), seguendo le istruzioni del produttore.

8.1.3 RT-qPCR

L'approccio diagnostico (vedi figura 8.1) seguito in questo studio prevedeva una prima RT-qPCR nei confronti di MNV-1 in modo da accertarsi che l'estrazione fosse avvenuta correttamente. In seguito, i campioni positivi per MNV-1 sono stati analizzati mediante RT-qPCR per HEV e Porcine Adenovirus (PAV). Quest'ultimo è un virus a DNA, specie-specifico e comunemente presente nelle feci suine; pertanto è stato utilizzato come indice di contaminazione fecale.

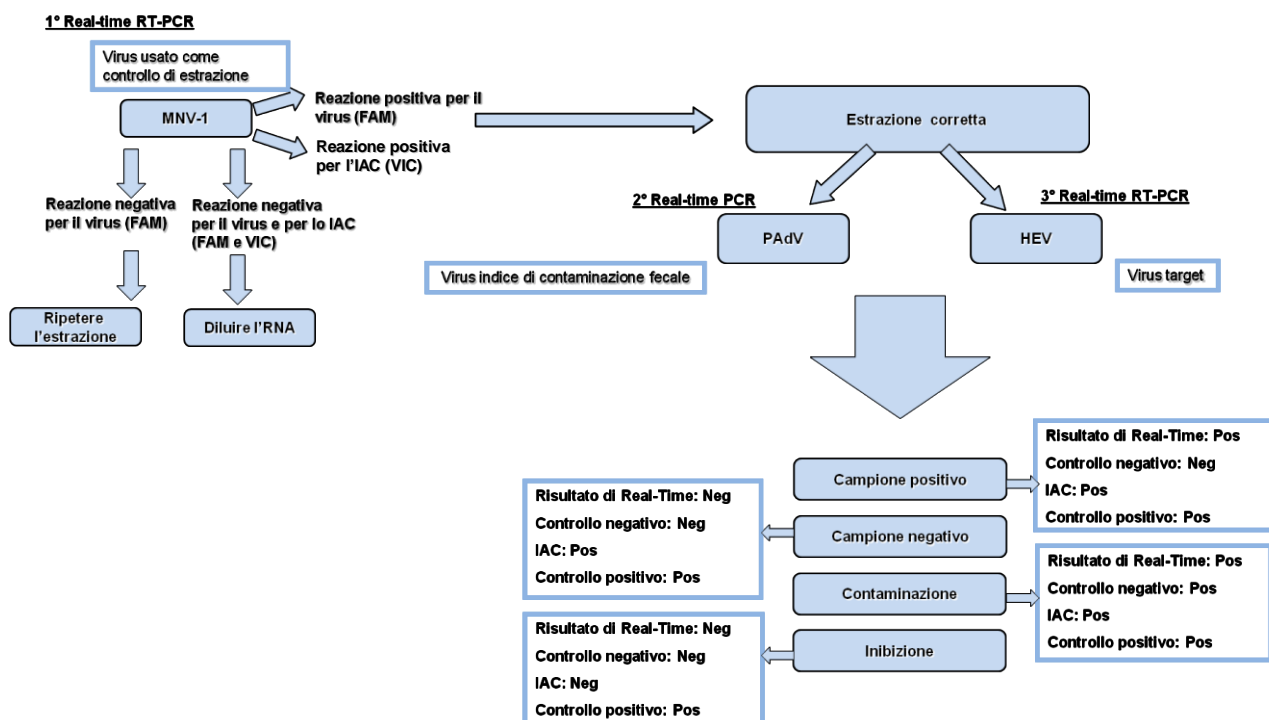


Figura 8.1: diagramma di flusso con le analisi effettuate e i relativi controlli utilizzati nel presente studio.

Tutti gli acidi nucleici estratti sono stati analizzati mediante RT-qPCR tal quali e diluiti 1:10. Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Tutte le RT-qPCR effettuate amplificavano contemporaneamente sia il virus target e che un *controllo interno di amplificazione* (*Internal amplification controls-IAC*). Lo IAC, costruito da Diez-Valcarce et al. (2011), è un plasmide contenente una regione di un ceppo batterico, a cui si lega la sonda specifica per lo IAC, fiancheggiata dalle sequenze dei primers del virus target. Questo viene inserito nella reazione di RT-qPCR ed è quindi amplificato contemporaneamente al virus in esame utilizzando gli stessi primers ma una sonda diversa. Nello specifico, le tre sonde che appaiano sui tre diversi virus ricercati sono marcate con 6-carbossi-fluorescina (FAM) mentre la sonda specifica dello IAC è marcata VIC (Applied Biosystem). La presenza dello IAC ha permesso di riconoscere eventuali inibizioni nella reazione di PCR e discriminare i veri negativi dalle inibizioni, particolarmente frequenti soprattutto in caso di RT-qPCR da matrici complesse come il muscolo e la salsiccia. I campioni IAC negativi sono stati ripetuti in diluizioni seriali in base 10.

➤ PAdV

Dieci µl del DNA estratto sono stati analizzati mediante duplice RT-qPCR come descritto da Hundesa et al. (2009). La mix di reazione conteneva 1x Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), i primers specifici, la sonda per PAdV, la sonda per lo IAC ed infine lo IAC contenente un frammento di PAdV (le concentrazioni sono riportate in tabella 8.1) per un volume finale di reazione di 25 µl. Le condizioni di amplificazioni sono state le seguenti: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da 45 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

➤ *HEV e MNV-1*

La RT-qPCR per HEV è stata effettuata come descritto da Jothikumar et al. (2006) mentre quella per MNV-1 è stata eseguito secondo il protocollo utilizzato da Baert et al. (2008). Per entrambi i virus la reazione, effettuata in un volume finale di 25 µl, conteneva 10 µl di RNA, 1x RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies), i primers, le due sonde e lo IAC, le cui concentrazioni finali sono riportate in tabella 8.1. Il profilo termico delle reazioni è stato il seguente: 50°C per 15 minuti, 95°C per 2 minuti e 45 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Virus		Concetrazioni finali	Sequenza	Riferimento bibliografico
PAdV	Primer sense PAdV-F	0.9 µM	AACGGCCGCTACTGCAAG	Hundesa et al. 2009
	Primer antisense PAdV-R	0.9 µM	AGCAGCAGGCTCTTGAGG	
	PAdV TaqMan Probe: PAdV-P	0,225 µM	5'-CACATCCAGGTGCCGCBHQ1-3')	
	IAC MGB TaqMan probe: IAC-P	50 nM	5'-VIC- CCA TAC ACA TAG GTC AGG -MGB-NFQ- 3'	
	IAC PAdV	100 copie		
HEV	Primer sense HEV-F	0,25 µM	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	Jothikumar et al. 2006
	Primer antisense HEV-R	0,25 µM	AGGGGTTGGTTGGATGAA	
	HEV Probe (Taqman probe): HEV-P	0,1 µM	5'-FAM- TGA TTC TCA GCC CTT CGC -BGQ1-3'	
	IAC MGB TaqMan probe: IAC-P	50 nM	5'-VIC- CCA TAC ACA TAG GTC AGG -MGB- NFQ- 3'	
	IAC HEV	300 copie		
MNV-1	Primer sense Fw-ORF1/ORF2	0,2 µM	CACGCCACCGATCTGTTCTG	Baert et al. 2008
	Primer antisense Rw-ORF1/ORF2	0,2 µM	GCGCTGCGCCATCACTC	
	MNV-1 Probe (Taqman probe): MGB-ORF1/ORF2	50 nM	5'-FAM-CGCTTTGGAACAATG-BGQ1-3'	
	Sonda IAC	50 nM	5'-VIC- CCA TAC ACA TAG GTC AGG -MGB- NFQ- 3'	
	IAC MNV-1	600 copie		

Tabella 8.1: concentrazioni d'uso di primers, sonde e *Internal amplification control* utilizzati per le RT-qPCR.

8.1.4 Genotipizzazione dei ceppi

I campioni positivi in RT-qPCR sono stati esaminati mediante RT-Nested PCR utilizzando coppie di primers che amplificano due regioni del capsido, rispettivamente di 121 e 348 bp (Erker et al., 1999; Huang et al., 2002). Quando possibile, i campioni positivi sono stati sequenziati e le sequenze nucleotidiche ottenute sono state depositate in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Gli accession number assegnati sono: JN861803, JN861804, JN861805, JN861806.

8.2 Risultati

8.2.1 RTq-PCR

➤ HEV nei suini e nei prodotti derivati

L'RNA del virus dell'epatite E è stato evidenziato nel 41% (14/34) dei campioni fecali prelevati dagli animali al macello mentre, sia nei fegati che nei muscoli, HEV è stato evidenziato nel 6% dei suini (rispettivamente 2/33 e 2/33). Va segnalato che i due soggetti positivi a livello epatico e quelli positivi a livello muscolare non sono gli stessi. Complessivamente, considerando sia l'impasto per salsicce prelevato in fase di lavorazione sia le salsicce già confezionate, sono stati esaminati 128 campioni. In nessuno di questi è stato rilevato l'RNA di HEV (tabella 8.2)

➤ PAdV nei suini e nei prodotti derivati

Porcine Adenovirus è stato identificato nel 91% (31/34) delle feci esaminate. Solo un muscolo dei 33 esaminati era positivo per PAdV, mentre tutti i fegati sono risultati negativi (tabella 8.2).

➤ HEV e PAdV nei tamponi ambientali

Tutti i 20 tamponi ambientali collezionati dai diversi punti considerati critici nel sito di lavorazione delle carni e al punto di vendita sono risultati negativi sia per HEV che PAdV (tabella 8.3).

Fase	Matrice	Virus testato	N° di campioni positivi/esaminati	%
Macello	Feci	Porcine Adenovirus	31/34	91%
		Hepatitis E	14/34	44%
	Fegato	Porcine Adenovirus	0/33	-
		Hepatitis E	2/33	6%
	Muscolo	Porcine Adenovirus	1/33	3%
		Hepatitis E	2/33	6%
Stabilimento di lavorazione	Macinato per salsiccia	Porcine Adenovirus	0/52	-
		Hepatitis E	0/52	-
Punto di vendita	Salsicce	Porcine Adenovirus	1/77	2%
		Hepatitis E	0/77	-

Tabella 8.2: tipologia e numero di campioni analizzati e risultati ottenuti mediante RT-qPCR

Fase	Superficie	Virus testato	N° di campioni positivi/esaminati
Stabilimento di lavorazione	Mani dei dipendenti	Porcine Adenovirus	0/3
		Hepatitis E	0/3
	Troclee per la macinazione	Porcine Adenovirus	0/11
		Hepatitis E	0/11
Punto di vendita	Maniglie delle porte WC	Porcine Adenovirus	0/2
		Hepatitis E	0/2
	Rubinetto	Porcine Adenovirus	0/1
		Hepatitis E	0/1
	WC	Porcine Adenovirus	0/3
		Hepatitis E	0/3

Tabella 8.3: tipologia e numero di tamponi ambientali analizzati e risultati ottenuti mediante RT-qPCR

8.2.2 Analisi delle sequenze ottenute

Sette dei 14 campioni HEV-positivi in RT-qPCR sono risultati positivi anche mediante RT-Nested PCR; questi sono stati sequenziati come precedentemente descritto e le sequenze nucleotidiche ottenute sono state utilizzate per la genotipizzazione dei ceppi virali identificati. Tre delle sequenze sono state ottenute utilizzando i primers descritti da Erker et al. (1999). Purtroppo queste sequenze sono troppo corte (121 bp) per consentire la sottotipizzazione la quale è pertanto stata effettuata solo sulle sequenze di 4 ceppi, ottenute utilizzando i primers di Huang et al. (2002). Le sequenze nucleotidiche di questi ceppi sono state depositate in GenBank. L'albero filogenetico, costruito utilizzando il software Bionumerics Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (figura 8.2), ha preso in considerazione i 4 ceppi italiani e altri ceppi europei ed extra-EU sia umani che suini.

L'analisi delle sequenze ha evidenziato che tutti appartenevano al genotipo 3 sottotipo c, mostrando tra loro un omologia nucleotidica del 99,4-100%.

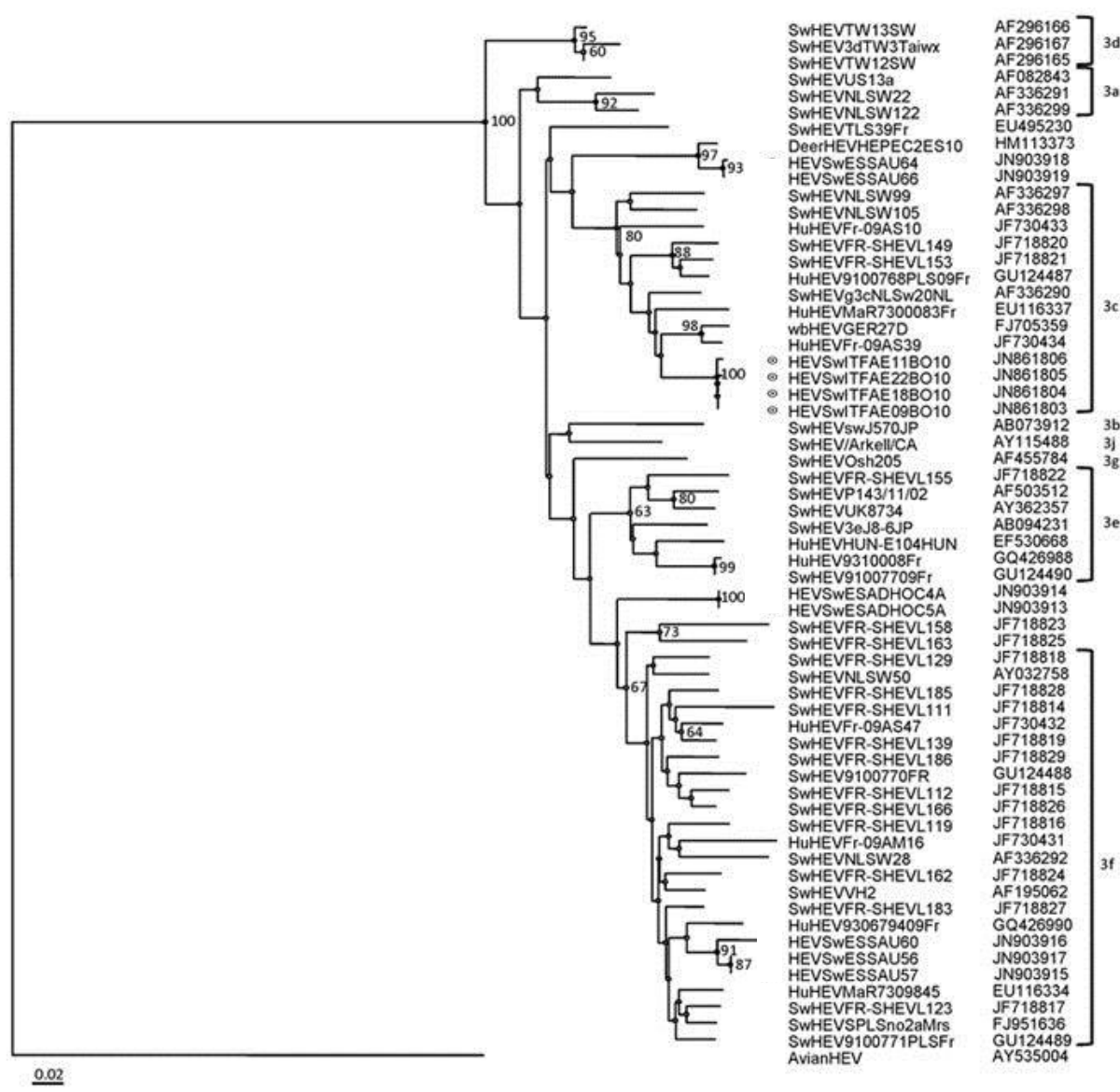


Figura 8.2: albero filogenetico delle sequenze parziali della OFR2 dei 4 ceppi italiani (indicate con il simbolo ⊙). L'albero è stato costruito con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) applicando il metodo neighbor-joining. Nella figura sono riportati i valori di Bootstrap >60% e i diversi sottotipi del genotipo 3. Infine la scala in basso a sinistra indica il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.

8.3 Discussione e conclusioni

Il virus dell'epatite E è stato evidenziato nei suini di diverse fasce di età, con prevalenze più elevate nei soggetti di 3-5 mesi di vita (Di Bartolo et al., 2008; Berto et al., 2012). Tuttavia, solo recentemente sono stati identificati animali positivi per SwHEV anche nei riproduttori e nei suini adulti. I risultati ottenuti da questi studi evidenziano un'elevata prevalenza (41%) del virus dell'epatite E anche negli animali in età di macellazione (9 mesi). Uno studio condotto nei macelli italiani nel 2011 (Di Bartolo et al., 2011) ha rilevato prevalenze di HEV molto simili (42%).

Inoltre, il virus è stato rilevato oltre che a livello fecale anche in sede epatica e muscolare. La prevalenza di HEV nel fegato (6%) è in linea con quanto descritto in altri Stati europei e in US (Feagins et al., 2007; Bouwknecht et al., 2007). Questo desta ovviamente preoccupazione in quanto il virus potrebbe essere trasmesso all'uomo mediante l'ingestione di organi e muscolo di suino se non sottoposti ad un adeguato trattamento termico (Feagins et al., 2008). Inoltre, le carcasse si potrebbero cross-contaminare durante le procedure di macellazione, se non correttamente eseguite. Infine, l'elevata presenza di HEV al macello potrebbe rappresentare un rischio per gli addetti alla macellazione. Uno studio condotto nel nostro Paese (Vulcano et al., 2007) evidenzia infatti come questa categoria lavorativa abbia valori di sieroprevalenza più elevati rispetto alla popolazione di controllo.

Per quanto concerne PAdV i risultati ottenuti evidenziano la validità di questo virus come indicatore di contaminazione fecale suina.

Malgrado l'elevata prevalenza di HEV negli animali macellati nessun campione di salsiccia è risultato positivo per HEV mentre solo un campione è risultato positivo per PAdV. Quest'ultima evidenza è probabilmente da riferire a una non corretta procedura di macellazione che ha portato a contaminazione fecale della carcassa. Tuttavia, i risultati ottenuti dimostrano come la filiera italiana di produzione dei prodotti suini possieda elevati standard igienico-sanitari per cui nonostante il 41% degli animali macellati fosse positivo per HEV, il virus non è stato rilevato in nessun prodotto carneo. Lo stesso è stato studiato condotto anche in Repubblica Ceca e Spagna (Di Bartolo et al., 2012) ottenendo risultati simili. A differenza dell'Italia, in Spagna HEV è stato rilevato anche nel 6% delle salsicce esaminate e PAdV nel 2% confermando come questi alimenti possano essere un rischio per il consumatore, soprattutto se non sottoposti ad una adeguata cottura (temperatura interna di 71°C per almeno 5 minuti (Feagins et al., 2007)).

Inoltre le elevate condizioni igieniche sono state confermate anche dall'analisi dei tamponi ambientali.

L'analisi delle sequenze dei ceppi ha mostrato come tutti appartenessero allo stesso genotipo 3c. I ceppi presentavano percentuali di identità nucleotidica molto elevate (fino al 100%): gli animali in esame provenivano tutti dallo stesso allevamento e pertanto è plausibile che fossero tutti infettati dal medesimo ceppo virale.

In conclusione lo studio dimostra come il virus dell'epatite E sia presente anche negli animali al macello e che, solo se vengono applicate delle idonee pratiche di macellazione, si può evitare la contaminazione della carcassa. In questo studio è stata utilizzata la RT-qPCR, in quanto considerata una metodica semi-quantitativa. Infatti, nonostante in questo caso i valori di Cycle threshold (Ct) non fossero correlati ad una curva standard per una quantificazione assoluta, essi fornivano ugualmente delle informazioni circa la quantità di RNA virale presente nel campione esaminato. In ogni caso, non essendo nota la dose infettante di questo virus, non si può escludere la possibilità che i prodotti di origine suina possano essere veicolo di malattia per l'uomo. Inoltre un recente studio (Barnaud et al., 2012) dimostra come il virus rimanga vitale se l'alimento viene sottoposto a cotture parziali. Infatti, in questo studio è stato dimostrato come HEV rimanga vitale nei patè prodotti con fegati di animali infettati sperimentalmente anche se trattati termicamente. Nello specifico i patè sono stati sottoposti a trattamenti termici con diverse temperature e diversi tempi di esposizione e in seguito sono stati utilizzati per infettare sperimentalmente un gruppo di suini per ogni tipologia di cottura. Solo nel caso in cui i patè sono stati sottoposti a una temperatura di 70°C per 20 minuti si è ottenuto un completo abbattimento dell'infettività virale, mentre nel caso di trattamenti più blandi o di più breve durata il virus è stato in grado di infettare gli animali inoculati. Infine, ad oggi non sono presenti studi che facciano luce sulla vitalità del virus e la sua resistenza nelle preparazioni di carne quando sottoposte a trattamenti di conservazione che non prevedono la cottura, come l'essiccazione o la salagione.

9 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nelle salsicce di fegato in Italia

9.1 Introduzione

I risultati ottenuti dal monitoraggio di HEV lungo la filiera di produzione suina hanno dimostrato che, nonostante i suini possano essere infetti al momento della macellazione, il prodotto finito sottoposto ad idonee pratiche di macellazione risulta negativo per la presenza del genoma virale. In base a questi risultati, allo scopo di approfondire le conoscenze relative al rischio di trasmissione per via alimentare di HEV, si è scelto di valutare l'eventuale presenza di SwHEV in una tipologia di alimenti ad alto rischio quali le salsicce di fegato, anche in considerazione del fatto che nel corso dallo studio precedente è emerso come il 6% dei fegati degli animali al macello risulti HEV-positivo. In precedenza, altri lavori hanno segnalato la presenza del virus sia nei fegati sia nelle salsicce prelevate presso negozi di alimentari. In Giappone, Stati Uniti, Paesi Bassi e in Inghilterra rispettivamente il 2-4,3%, l'11%, il 6,5% e 3% dei fegati commercializzati sono risultati positivi per l'RNA di SwHEV (Yazaki et al., 2003; Feagins et al., 2007 ; Okano et al., 2013; Berto et al., 2012; Bouwknecht et al.; 2007); inoltre un recente studio condotto in Francia ha evidenziato la presenza del genoma di HEV nel 36,4% dei fegati e nel 37% delle salsicce di fegato esaminate (Martin-Latil et al., 2014).

E' stato segnalato che le salsicce di fegato sono state l'alimento responsabile della trasmissione di HEV all'uomo: in Corsica, un piccolo focolaio di epatite E è stato collegato al consumo di *"figatellu"*, una salsiccia di fegato tipica della zona. In questo caso, le sequenze nucleotidiche di HEV identificate nei *"figatellu"* analizzati e nei pazienti erano identiche, confermando pertanto l'origine alimentare del focolaio (Colson et al., 2010). La salsiccia di fegato è stata scelta per il presente studio, sia in considerazione di questi dati, sia perché sottoposta ad una maggiore lavorazione (che potrebbe aumentare la probabilità di contaminazioni crociate) e perché in molte regioni italiane viene consumata cruda, poco cotta o a seguito di brevi periodi di essiccazione. Infine, una stessa salsiccia potrebbe contenere fegati provenienti da più animali.

L'approccio diagnostico seguito è stato il medesimo del precedente lavoro ma, per poter valutare in termini semi-quantitativi il grado di contaminazione, è stata messa a punto una RealTime-PCR quantitativa, mediante la costruzione di una curva standard sia per HEV sia per NoV murino; in questo modo è stato possibile avere una stima del numero di genomi equivalenti presenti nell'alimento in esame.

9.2 Materiali e metodi

9.2.1 *Prelievo dei campioni di salsiccia*

Le salsicce sono state acquistate presso una macelleria che effettuava sia la lavorazione che il confezionamento. Sono state acquistate 8 confezioni (da 300 gr ciascuna) di salsicce di fegato fresche ed essiccate, corrispondenti a 30 salsicce di circa 80 grammi ciascuna.

Le confezioni sono state acquistate in quattro diverse settimane per assicurarsi che i colli appartenessero a diversi lotti di animali; il campionamento è stato effettuato durante i mesi di gennaio-febbraio 2013, in quanto questi prodotti sono tipicamente consumati durante la stagione invernale.

Ogni salsiccia è stata tagliata in tre fette, il grasso è stato scartato manualmente, e sono stati ottenuti 45 e 42 pezzi (del peso di 250 mg ciascuno) di salsicce di fegato rispettivamente fresche e secche.

9.2.2 *Preparazione del campione ed estrazione dell'RNA virale*

Come per lo studio precedente, tutti i campioni sono stati artificialmente contaminati con 5 µl di una sospensione di Norovirus murino (10^5 TCID₅₀), che è stato utilizzato come controllo del processo di estrazione (vedi Materiali e metodi, capitolo 8.1.2). I campioni sono stati omogeneizzati meccanicamente in 2,5 ml di tampone di lisi (RTL) utilizzando una sfera di acciaio sterile (5 mm, QIAGEN) e lo strumento Tissue Lyser (QIAGEN). L'omogenato è stato centrifugato a 5000 X g per 20 minuti ed il surnatante è stato utilizzato per estrarre l'RNA con il kit RNeasy Midi (QIAGEN), secondo le istruzioni del produttore. L'RNA totale è stato eluito in 100 µl di acqua bidistillata *RNasi free*.

9.2.3 *RT-qPCR*

Tutte le miscele di reazione prevedevano l'utilizzo di un controllo di processo, lo IAC (vedi capitolo 11.2.3 oppure Diez-Valcarce et al., 2011); nella medesima reazione sono stati pertanto amplificati sia il virus target (NoV murino, HEV o PAdV) le cui sonde (probe) sono marcate con FAM (6-carbossi fluoresceina) che lo IAC, il quale viene amplificato con gli stessi primers dei virus in esame ma che possiede una specifica sonda marcata con VIC (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

➤ *RT-qPCR per la rilevazione di NoV murino e HEV*

Dieci microlitri di RNA sono stati analizzati per il rilevamento di NoV murino o HEV mediante duplex RT-qPCR, rilevando sia IAC che il virus bersaglio (Baert et al., 2008; Jothikumar et al., 2006; Di Bartolo et al., 2012). Ciascun campione è stato analizzato in doppio e le reazioni sono state eseguite utilizzando il kit di reazione RNA UltraSense (Lifetechnologies) come descritto precedentemente (capitolo 8.1.3). I campioni risultati negativi sono stati analizzati nuovamente utilizzando una diluizione 1:10 dell'RNA.

➤ *RT-qPCR per la rilevazione di PAdV*

Dieci microlitri di acido nucleico sono stati analizzati anche per PAdV mediante duplex qPCR come descritto in precedenza (capitolo 8.1.3).

9.2.4 RT-qPCR quantitativa per NoV murino e HEV

Per quantificare la carica virale presente nelle salsicce di fegato analizzate, sono state realizzate due curve standard, una per ogni virus, di RT-qPCR (figura 9.1).

Gli RNA dei ceppi utilizzati sono stati estratti da sospensioni fecali al 10% utilizzando il kit di estrazione QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Gli ampliconi sono stati ottenuti mediante *One Step Reverse-Transcription PCR* (RT-PCR One Step, QIAGEN), seguendo le istruzioni del produttore.

Per NoV murino, è stato amplificato un frammento genomico di 326 bp nella regione di sovrapposizione tra l'ORF1 e l'ORF2 di un ceppo italiano di NoV murino (ISSMuNoV), utilizzando i primers FNoV murino ISS 5'-CTGCCATGCATGGTGAAAAG-3' e RNoV murino ISS 5'-GTCAATTTGGTTAATTTGCCCCG-3'. L'amplicone ottenuto è stato ligato nel vettore commerciale pGEM-Teasy (Promega) e il vettore ricombinante ottenuto, denominato pMuNoVISS è stato utilizzato per la trascrizione *in vitro* come descritto di seguito.

Per HEV, un plasmide denominato pGEMORF1-2-3HEV è stato costruito clonando in pGEM-Teasy (Promega) un frammento genomico 890 bp, amplificato mediante il primer sense ISP (5'-CCGTGTTTATGGAGTTAGCCC-3'; Zhai et al., 2006 che appaia nella ORF1) e l'antisense R2 (5'-GGGCTGAACCAAATCCTGACATC-3'; Kasorndorkbua et al., 2005 che appaia nella ORF2). È stata così ottenuta la regione a cavallo tra ORF1 e ORF2 del ceppo italiano SwHEVE2NAIT12 (Acc. ceppo di riferimento M73218).

L'RNA sintetico è stato ottenuto mediante trascrizione *in vitro* dei cloni pMuNoVISS o pGEMORF1 - 2 - 3HEV mediante il kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (Promega) a partire dal promotore T7 presente nel vettore pGEM-Teasy a monte del frammento clonato, seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA sintetico ottenuto è stato trattato con DNasi (Sigma), recuperato mediante soluzione fenolo-cloroformio, precipitato con etanolo e risospeso in acqua DEPC. L'RNA è stato infine quantificato mediante spettrofotometria e conservato in aliquote a -80 °C. Le curve standard di NoV murino o HEV sono state quindi generate confrontando i valori Cq con il logaritmo

del numero di copie degli RNA sintetici utilizzati in diluizioni seriali in base 10. Per il calcolo del numero di copie si è utilizzato il numero di Avogadro.

9.2.5 RT-nested PCR per HEV e PadV

Due diverse RT-nested PCR sono state eseguite per l'amplificazione di due regioni virali che amplificano due diversi frammenti del gene *ORF1*: 287 bp della Mtasi (Erker et al., 1999) e 350 bp della RNA-dipendente RNA-polimerasi (Zhai et al., 2006) utilizzando il kit One-step RT-PCR (Qiagen).

Per PAdV, una PCR seguita da nested-PCR è stata eseguita come descritto da Maluquer de Motes et al. (2004) ed è stato amplificato un frammento di 344 bp del gene codificante gli esoni virali.

Controlli positivi e negativi sono stati inclusi in ogni fase, dalla estrazione dell'RNA alla nested-PCR.

9.2.6 Sequenziamento

Gli ampliconi di DNA ottenuti da campioni positivi sono stati purificati mediante ExoSAP (Affimetrix) e, quando la quantità di DNA era sufficiente, sono stati sequenziati. Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite da BIOFAB (BIOFAB s.r.l., Roma) e le sequenze ottenute sono state depositate in NCBI GenBank (Mtase). Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate usando il software Bionumerics packages v.6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio).

I ceppi di HEV identificati sono stati confrontati con quelli disponibili in NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o già disponibili nel laboratorio. Le analisi filogenetiche sono state eseguite con il software Bionumerics software packages v.6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio), utilizzando il metodo UPGMA.

9.3 Risultati

9.3.1 Correlazione tra le PFU e i genomi equivalenti di MNV-1 e calcolo delle percentuali di recupero di NoV murino in fase di estrazione

I campioni sono stati contaminati con quantità note di NoV murino di cui erano note le PFU/ml. Attraverso la RT-qPCR, mediante la curva standard, è stata calcolata la relazione tra i genomi equivalenti recuperati durante l'estrazione di RNA e le PFU. Lo stesso esperimento, ripetuto in 4 giorni

diversi da 4 operatori (per un totale di 21 repliche effettuate), ha messo in evidenza che per NoV murino il numero di PFU è equivalente al numero di GE.

Il tasso di recupero dell'RNA è stato calcolato come rapporto tra il numero di GE di NoV murino recuperati dopo estrazione dell'RNA dalle salsicce e le copie GE di NoV murino usati per l'inoculo dei campioni. Anche in questo caso l'esperimento è stato ripetuto in più giorni e da diversi operatori per un totale di 28 repliche; inoltre sono state analizzate sia salsicce positive che negative per HEV. Il tasso di recupero medio di NoV murino rilevato è stato del 9,8% (range: 0,36-31 %).

9.3.2 RT-qPCR, RT-PCR e analisi delle sequenze

Tutti i 45 campioni di salsiccia di fegato fresca e 23 dei 42 campioni di salsiccia di fegato secca sono risultati positivi per NoV murino. Nonostante siano stati effettuati diversi tentativi, incluse diluizioni seriali in base 10 dell'RNA e analisi con altre metodiche (RT-nested PCR) non sono stati ottenuti ulteriori campioni positivi, indicando che alcune delle estrazioni di RNA effettuate non sono avvenute con successo.

Solo i campioni positivi per NoV murino sono stati analizzati sia per HEV suino sia per PAdV mediante RT-qPCR e qPCR, come precedentemente descritto (vedi materiali e metodi, capitolo 8). PAdV è stato utilizzato come indicatore di contaminazione fecale di origine suina (Hundesa et al., 2009).

Cinque delle 8 confezioni acquistate contenevano almeno una salsiccia positiva alla ricerca del genoma di HEV (tabella 9.1), mentre il 22,2% (10/45) dei pezzi di salsicce fresche e il 8,7% (2/23) delle secche sono risultate positive per l'RNA di HEV mediante RT-qPCR. Sulla base dei risultati di real-time PCR, considerando gli equivalenti dei volumi utilizzati, è stato stimato che le salsicce di fegato esaminate contenevano tra 5×10^2 e 5×10^4 GE di HEV ogni 250 mg. Il numero GE più basso è stato ottenuto in una fetta di salsiccia fresca e in una di salsiccia secca (tabella 9.1).

Tutti gli RNA sono stati ulteriormente analizzati con RT-PCR e PCR, rispettivamente per HEV e PAdV. Le RT-PCR per HEV sono state eseguite utilizzando due coppie di primers che appaiano in due diversi frammenti del gene ORF1 (indicati in tabella 6.2 del capitolo 6 come PCR 4 e 6). Tutti i campioni sono risultati negativi per PAdV sia in real-time PCR (Hundesa et al., 2008) che in PCR convenzionale, suggerendo l'assenza di contaminazione fecale diretta. Al contrario, il genoma HEV è stato rilevato in almeno una delle due RT-PCR eseguite, in 2 fette di salsicce di fegato fresche su 45 (4,4%) esaminate e in 2 fette di salsiccia di fegato secca su 23 (8,7%) (tabella 9.1). Quindi, come riportato in tabella 9.1, solo 3 su 11 campioni positivi mediante RT-qPCR sono stati confermati come tali in RT-PCR. Un campione negativo in RT-qPCR (SAL 59) è invece risultato positivo in RT-nPCR utilizzando i primers che appaiano sull'RdRp.

			HEV		PAdV			
Fetta	Salsiccia	Confezione	HEV qPCR	RT- N°GE/250mg	Mtasi	RdRP	PAdV qPCR	RT- PAdV
sal8	3	1	POS	2.18×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal9	3	1	POS	6.96×10^2	NEG	NEG	NEG	NEG
sal12	4	1	POS	1.34×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal14	5	2	POS	5.42×10^4	NEG	NEG	NEG	NEG
sal15	5	2	POS	1.70×10^3	POS	POS	NEG	NEG
sal25	9	2	POS	6.34×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal27	9	2	POS	2.34×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal30	10	3	POS	1.47×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal31	10	3	POS	2.19×10^3	NEG	NEG	NEG	NEG
sal32	12	3	POS	4.69×10^3	NEG	POS	NEG	NEG
sal59	19	4	NEG	-----	NEG	POS	NEG	NEG
sal83	27	5	POS	5.7×10^2	POS	POS	NEG	NEG

Tabella 9.1: risultati ottenuti in RT-qPCR e RT-PCR per HEV e per in qPCR e PCR per PAdV.

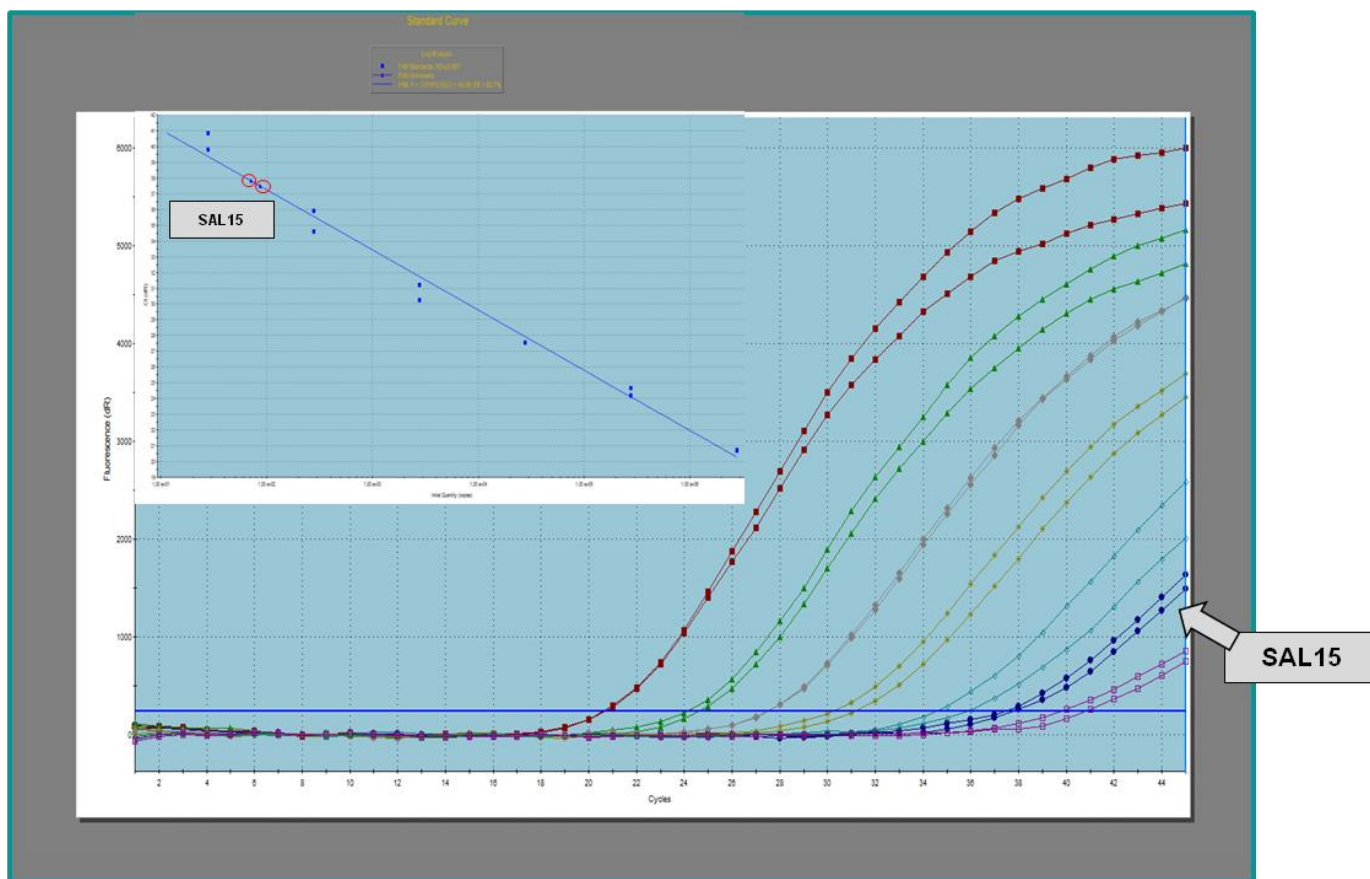


Figura 9 1: campione positivo (SAL15) per HEV mediante RT-qPCR e relativa curva standard ottenuta da diluizioni in base 10 del trascritto sintetico. Nel campione di salsiccia di fegato positivo erano presenti 8×10^1 GE.

Complessivamente, sono stati sequenziati quattro frammenti di RdRp (sal15, sal32, sal59 e sal83), uno dei quali (sal32) è risultato troppo corto per essere sottomesso in GenBank. Tuttavia, l'allineamento delle quattro sequenze nelle regioni sovrapposte (110 nt) ha mostrato un'identità nucleotidica che variava dal 72,7% all'88,3 % (figura 9.2), confermando che sono stati individuati tre diversi ceppi di HEV. Un valore simile di identità nucleotidica (89%) è stato ottenuto anche allineando i frammenti MTase (figura 9.4) delle due sequenze disponibili (campioni sal 83 e sal 15). Gli alberi filogenetici sono stati creati utilizzando i frammenti sia RdRp che di MTase.

I risultati di questo studio hanno messo in evidenza una correlazione tra i ceppi di HEV rilevati nelle salsicce di fegato e quelli suini e umani riportati in Europa, Italia compresa. L'identità nucleotidica più alta con ceppi suini italiani è stata del 91% nella RdRp e del 86,7% nella MTase (figura 9.3 e 9.4).

Nessuna delle sequenze di genoma virale ottenute sembra essere correlata a casi umani italiani esaminati fino ad oggi. Tuttavia, spesso vengono utilizzate regioni diverse per la diagnostica di HEV e queste si sovrappongono solo in parte con i frammenti amplificati dai primers utilizzati in questo studio. Pertanto non è possibile trarre delle conclusioni definitive.

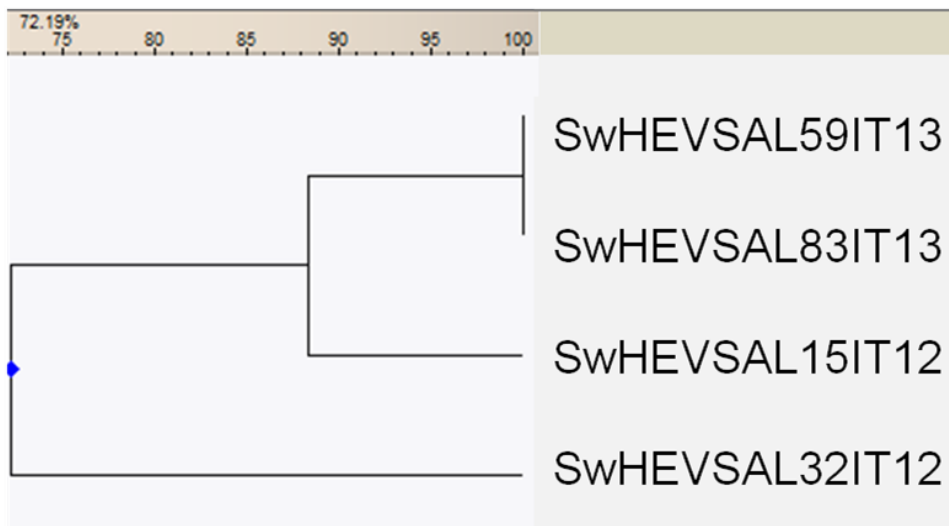


Figura 9.2: dendrogramma costruito con il metodo UPGMA dei 4 frammenti di 110 bp della RdRp identificati nelle salsicce di fegato. L'albero è stato costruito con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium); la scala in alto indica la percentuale di identità nucleotidica.

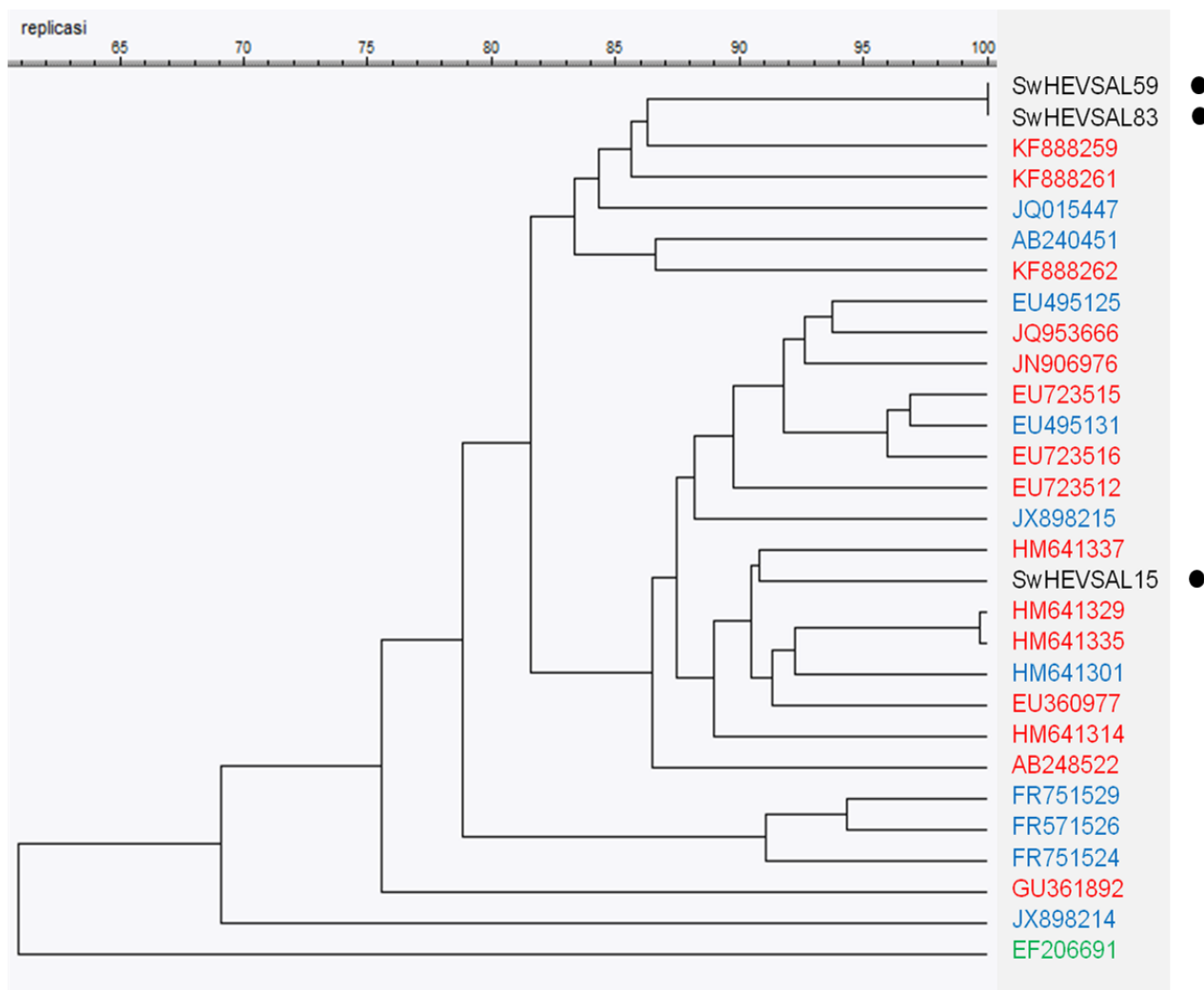


Figura 9.3: dendrogramma costruito con il metodo UPGMA costruito con le 3 sequenze parziali codificanti l'RdRp (in nero) ottenute dalle salsicce di fegato e ceppi suini (rosso) e umani (blu). Il ceppo aviare (verde) è stato utilizzato come outgroup. L'albero è stato costruito con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium); la scala in alto indica la percentuale di identità nucleotidica.

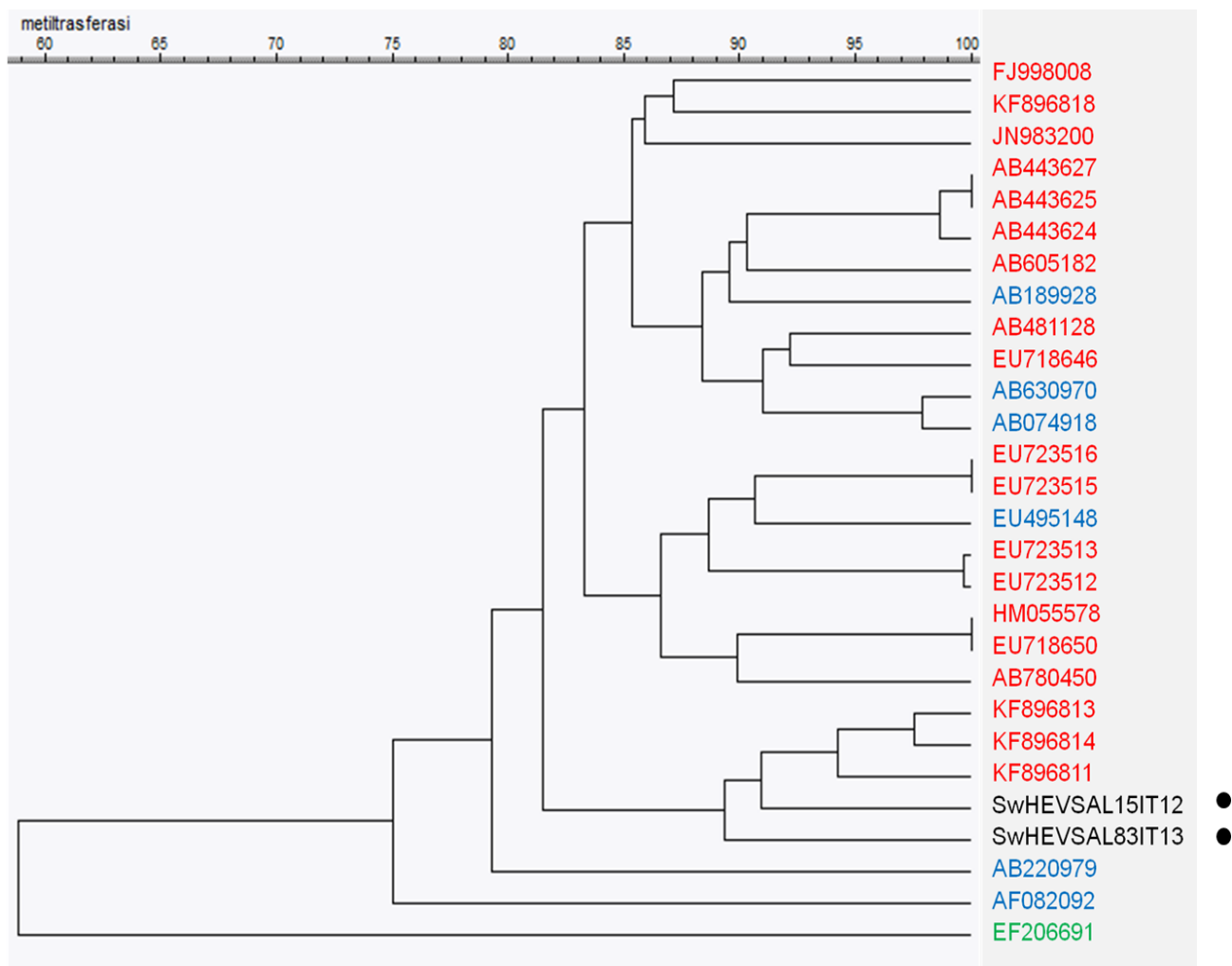


Figura 9.4: dendrogramma costruito con il metodo UPGMA costruito con 2 sequenze parziali (in nero) ottenute dalle salsicce di fegato codificanti per la MTasi virale; in rosso sono evidenziati i ceppi suini ed in blu quelli umani. Il ceppo aviare, in verde, è stato utilizzato come outgroup. L'albero è stato costruito con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium); la scala in alto indica la percentuale di identità nucleotidica.

9.4 Discussione

In letteratura sono disponibili pochi dati quantitativi sulla presenza di HEV sia negli alimenti che nei diversi campioni (di origine animale e/o umana) prelevati per la diagnostica (Martin-Latil et al., 2012, Leblanc et al., 2010); inoltre la dose infettante del virus è ancora sconosciuta. Infatti, ad oggi non esistono sistemi efficaci di replicazione virale *in vitro*, pertanto per una valutazione quantitativa vengono utilizzate principalmente metodiche biomolecolari, come la real-time quantitativa. Tuttavia, il rapporto tra GE rilevati e particelle infettive può variare, come dimostrato per altri vi-

rus come ad esempio quello dell'epatite A (Hewitt e Greening 2006), norovirus murino (Baert et al., 2008), il Nipah virus (Guillaume et al., 2004) ed altri (Martin-Latil et al., 2012). Inoltre, la valutazione dei dati quantitativi molecolari dovrebbe prendere in considerazione anche il tasso di recupero dell'RNA in seguito alle procedure di estrazione adottate (Martin-Latil et al., 2014). Per tale ragione, è stato utilizzato norovirus murino come controllo di processo sia in questo studio che in uno studio precedente (Martin-Latil et al., 2014), essendo un virus appartenente alla famiglia delle *Caliciviridae*, e quindi con un'organizzazione genomica molto vicina a quella di HEV. I risultati ottenuti con NoV murino hanno messo in evidenza che il tasso di recupero dell'RNA può essere molto basso se non nullo, perché l'efficienza di estrazione dell'RNA, e quindi anche le successive analisi, sono influenzate da diversi fattori; ad esempio la presenza di inibitori, il tipo di matrice analizzata e altri fattori tecnici spesso difficilmente identificabili possono diminuire sensibilmente l'efficienza del processo. In questo studio, il controllo di processo non è stato recuperato da 19 su 42 salsicce di fegato secche, e il tasso di recupero dell'RNA dalla matrice salsiccia variava tra lo 0 e il 31 %. Pertanto, l'uso di controlli di processo è essenziale nei metodi di rivelazione di virus ad RNA negli alimenti (Martin-Latil et al., 2012).

Se viene preso in considerazione il tasso di recupero dell'RNA di NoV murino, il numero effettivo di GE di HEV rilevati per 250 mg di salsiccia di fegato potrebbe essere costantemente superiore ai 5×10^2 - 5×10^4 rilevati in questo studio. Infatti, altri lavori hanno rilevato una maggiore quantità di copie di HEV sia nel fegato (10^7 per grammo, Leblanc et al., 2010), che nelle salsicce di fegato (figatellu) di maiale (10^6 copie per fetta), il cui consumo è alla base di un piccolo focolaio di epatite E (Colson et al., 2010).

In questo studio, oltre alla real-time RT-PCR, per rilevare il genoma di HEV, sono state utilizzate anche RT-PCR convenzionali. I risultati confermano come la prima metodica sia più sensibile (Gyarmati et al., 2007) rispetto alla seconda: infatti solo tre su 11 campioni sono stati confermati positivi in PCR convenzionale. Le differenze rilevate risultano indipendenti dal titolo virale, in quanto anche campioni che presentavano titolo maggiore (valori di Cq inferiori) sono risultati negativi in RT-PCR convenzionale (tabella 9.1). La sensibilità dei due metodi diagnostici può variare sia in base alla regione amplificata che in base ai genotipi o sottotipi di HEV presenti nel campione; è stato dimostrato che la variabilità genetica del virus può determinare difficoltà nella rilevazione di campioni positivi (Mokhtari et al., 2013). Va segnalato che in un caso, un campione RT-qPCR negativo è risultato positivo in RT-PCR convenzionale. Pertanto è fondamentale affiancare più metodiche al fine di migliorare l'affidabilità dei risultati.

9.5 Conclusioni

Il presente studio conferma la presenza del genoma di HEV nelle salsicce di fegato, sia fresche che essiccate. La mancata rilevazione di PAdV conferma quanto rilevato nello studio precedente, ovvero che i rischi di contaminazione fecale crociata dei prodotti di origine suina durante la lavorazione

sono trascurabili in Italia (Di Bartolo et al., 2102). Tuttavia, i dati indicano che le procedure di lavorazione per la produzione di salsiccia di fegato di maiale sostanzialmente non abbattano la carica virale endogena. Va comunque chiarito che l'individuazione di brevi sequenze del genoma di HEV non implica necessariamente la presenza del virus infettivo. Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato, in seguito ad infezione sperimentale di animali o di colture cellulari 3D, la presenza in questi alimenti di particelle di HEV vitali e infettive (Feagins et al., 2006 ; Berto et al., 2013a, Berto et al., 2013b). Inoltre HEV sembra avere un'elevata resistenza ai trattamenti termici utilizzati nei processi industriali per la preparazione di prodotti di origine suina (Barnaud et al., 2012).

I tre ceppi di HEV sequenziati sono strettamente correlati con altri ceppi suini rilevati sia in Italia e che in altri Paesi europei. Questo risultato non è sorprendente in quanto sia animali che prodotti di carni suine (compresi fegato ed interiora) vengono abitualmente importati ed esportati dall'Italia da/verso altri paesi europei ed extra-UE (Dati Istat), favorendo la circolazione nel nostro Paese di ceppi di HEV stranieri.

Nonostante i dati riportati sulla presenza di HEV negli alimenti destino una notevole preoccupazione in termini di sicurezza alimentare, ad oggi il numero di casi umani di infezioni da HEV riportati in Italia, come in altri paesi industrializzati, rimane basso. Tuttavia, la diagnosi molecolare di HEV nel fegato dovrebbe essere usata per consigliare i consumatori verso il consumo di carne suina solo dopo un'adeguata cottura.

10. Prove di replicazione in vitro del virus dell'epatite E

10.1 Introduzione

Solo di recente sono state identificate cellule permissive alla crescita *in vitro* del genotipo 3 di HEV. Tuttavia, l'efficienza di replicazione è bassa, e il virus replica lentamente, senza effetto citopatico evidente, impiegando dai 28 ai 60 giorni per raggiungere un titolo virale tra 10^5 e 10^6 GE (Rougee et al., 2013, Okamoto et al., 2013). Inoltre, numerosi studi dimostrano come la maggior parte delle linee cellulari identificate come permissive per HEV, ne supportino la replicazione in maniera efficace solo se infettate con campioni a elevato titolo virale (Okamoto, 2013). Tecnicamente l'infezione delle cellule è resa complessa anche dal tipo di matrice disponibile per l'infezione; infatti generalmente questa è rappresentata da campioni fecali (fortemente contaminati da altri microrganismi), fegato o più raramente il siero. Il siero, proveniente da soggetti infetti in fase viremica può presentare titoli virali particolarmente elevati, che vengono raggiunti raramente in campioni di alimenti (salsicce o fegati) (Berto et al., 2013, Takahashi et al., 2012). Tuttavia, la viremia è transitoria e, specialmente nel suino asintomatico, è difficile individuare il momento opportuno per il prelievo ai fini dell'isolamento.

Durante i tre anni del dottorato di ricerca sono stati condotti diversi esperimenti per l'isolamento di SwHEV genotipo 3 in colture cellulari, senza tuttavia successo.

In base ai dati disponibili in letteratura, sono state selezionate e utilizzate cellule di epatocarcinoma umano (PLC/PRF/5) e cellule di carcinoma polmonare umano (A549), in quanto alcuni studi (Emerson et al., 2004; Tanaka et al., 2007) dimostravano come il virus possa replicare su tali cellule, anche se con tempi di replicazione molto lunghi. Sono state utilizzate anche cellule di testicolo di suino (ST100), in uno stadio di differenziazione ancora iniziale e permissive per molti virus di origine suina, come ad esempio il Parvovirus suino (PPV), il virus della gastroenterite trasmissibile (TGE) e altri enterovirus suini (Zhang et al., 2010, Park et al., 2007, Nilsson et al., 1993).

10.2 Materiali e Metodi

10.2.1 Campioni e preparazione dell'inoculo per l'infezione

E' stato utilizzato il ceppo SwHEV E2IT12 identificato in un campione fecale suino, di cui era stata ottenuta la sequenza dell'intero genoma (vedi capitolo 7) e di cui era stato valutato il titolo virale mediante RT-qPCR (vedi capitolo 7).

In un secondo esperimento, invece è stato scelto un campione HEV-positivo di salsiccia di fegato (indicato come sal32, vedi capitolo 9).

➤ *1° inoculo*: il campione fecale è stato risospeso al 90% (peso/volume) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; GIBCO) contenente penicillina, streptomycina e amfotericina (GIBCO). La sospensione fecale è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 min a 4°C. Il supernatante è stato raccolto, procedendo immediatamente alla ricerca di HEV (mediante real-time RT-qPCR), di altri virus gastroenterici (mediante PCR) e all'infezione delle colture cellulari. Sono stati evitati congelamenti e scongelamenti, che avrebbero potuto ridurre la carica di virus infettante presente nel campione.

L'RNA totale è stato estratto da 200 µl di sospensione fecale ed è stato analizzato per quantificare il virus presente mediante real-time RT-qPCR (vedi materiali e metodi, capitoli 6 e 9).

➤ *2° inoculo*: cinquecento mg di salsiccia di fegato positiva in real-time RT-qPCR sono stati omogenati meccanicamente (Tissue Lyser, QIAGEN) in 2 ml di terreno, come descritto in precedenza. L'omogenato è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 min a 4°C e successivamente suddiviso in due aliquote da 1 ml; 200 µl di un'aliquota sono stati utilizzati per l'estrazione e la quantificazione del campione (vedi materiali e metodi, capitolo 9). Anche in questo caso, la determinazione quantitativa della carica virale presente nel campione e l'infezione sono avvenute lo stesso giorno.

10.2.2 Campioni e preparazione dell'inoculo per l'infezione

L'RNA estratto è stato utilizzato per la ricerca del genoma dei principali virus enterici del suino, in quanto possibili interferenti con la replicazione di HEV. La ricerca di questi patogeni è stata effettuata mediante PCR o RT-PCR, secondo i protocolli descritti in letteratura. Nello specifico, il campione è stato analizzato per PAdV (Maluquer de Motes et al., 2004), PCV2b (Navidad et al., 2008), TTV (Martelli et al., 2006), Rotavirus (Matthijssens et al., 2008), Swine Astrovirus (More et al., 2012), Kobuvirus (Reuter et al., 2009) e Sapovirus (Kim et al., 2006) mediante PCR o RT-PCR, risultando negativo per tutti i virus sopraelencati. Per l'infezione sono stati utilizzati 200 µl di sospensione fecale.

10.2.3 Infezione in vitro

Monostrati di cellule A549, PLC/PRF/5 e ST100 sono stati ottenuti in DMEM addizionato con 10% (vol/vol) di siero fetale bovino (FBS, inattivato termicamente), contenente penicillina, streptomycina e amfotericina B (GIBCO).

Le cellule sono state incubate a 37°C con atmosfera umidificata, al 5% di CO₂ (Tanaka et al., 2007).

Prima dell'infezione delle cellule, il terreno di crescita è stato eliminato e sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS (pH 7,5) senza Ca²⁺ e Mg²⁺.

Le cellule in fiasche T12 (4x10⁶ cellule) sono state infettate con 200 µl di sospensione fecale o 250 µl o 500 µl di omogenato di salsiccia di fegato. Le infezioni sono state condotte in doppio per

ognuna delle tre linee cellulari e sono stati inclusi controlli negativi, inoculati rispettivamente con 200 µl, 250 µl e 500 µl di PBS sterile.

Le cellule sono state incubate per 1 h a temperatura ambiente; in seguito l'inoculo è stato rimosso e sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS sterile; infine sono stati aggiunti 3 ml di terreno di mantenimento (costituito al 50% da DMEM e al 50% da medium 199, 2% FBS, 30mM MgCl₂ L-Glutammina, penicillina G, streptomicina e amfotericina B (GIBCO).

Le cellule sono state quindi incubate 37° C (5% CO₂) per 2 giorni. Ogni giorno, a partire dal giorno 0, sono stati prelevati 1,5 ml di sovrinatante, sostituiti con nuovo terreno di mantenimento. L'esperimento è stato condotto come descritto da Takahashi et al. (2012).

Un'aliquota (150 µl) del terreno rimosso ad ogni passaggio è stata collezionata e conservata a -70°C fino al suo utilizzo. Questo è stato poi analizzato mediante RT-qPCR per la ricerca di HEV.

10.3 Risultati

Mediante RT-qPCR (vedi capitolo 9), è stato valutato il titolo di HEV sia nella sospensione fecale che nell'omogenato di salsiccia. Nel primo erano presenti 4×10^4 genomi equivalenti in 5 µl mentre nel caso dell'omogenato di salsiccia $1,2 \times 10^2$ GE in 5 µl.

In base ai protocolli descritti in letteratura (Takahashi et al. 2012), l'infezione con il campione fecale è stata condotta con una MOI = 0,1. Questo valore indica il rapporto tra il numero di virioni con cui si infetta e il numero di cellule in coltura, e purtroppo, data la bassa carica virale, non è stato rispettato nel caso dell'omogenato di salsicce di fegato.

L'osservazione quotidiana delle cellule, non ha inizialmente mostrato differenze rispetto al controllo negativo. Tuttavia, nel monostrato di ST100 infettate con sospensione fecale, a 10 giorni p.i. è stato evidenziato un forte effetto citopatico (CPE), con perdita di integrità del monostrato cellulare. L'esperimento è stato quindi interrotto e sono state raccolte cellule e sovrinatante. Il medesimo effetto è stato rilevato nelle cellule A549 a 33 giorni p.i. mentre nessun effetto è stato rilevato per le PCL/PRF/5 e pertanto l'esperimento è continuato fino a 35 giorni p.i.

Gli studi effettuati sulla crescita *in vitro* di HEV non riportano la comparsa di CPE in seguito all'infezione *in vitro* (Okamoto et al., 2013). L'acido nucleico estratto dai supernatanti di coltura è stato pertanto riesaminato sia per HEV mediante RT-qPCR che per i principali virus enterici del suino mediante PCR e RT-PCR (vedi sopra). E' stato così identificato Astrovirus in entrambe le linee cellulari mostranti CPE. Il campione era già stato esaminato per questo virus nella fase preliminare dello studio, risultando negativo. Si può supporre che la quantità di virus presente nell'inoculo non fosse sufficiente per essere diagnosticata mediante RT-PCR e che essa sia aumentata significati-

vamente in seguito a replicazione virale in linee cellulari permissive, tanto da poter essere rilevata utilizzando la stessa metodica.

Al 35° giorno p.i. i sovrinatanti di cultura raccolti dalle tre linee inoculate con l'omogenato di salsiccia e dall'infezione con sospensione fecale delle cellule PCL/PFR/5 sono stati analizzati mediante Real-Time RT-PCR per la ricerca di genoma virale di HEV, ma nessuno dei campioni è risultato positivo. Pertanto si è deciso di interrompere l'esperimento.

10.4 Discussione

L'infezione *in vitro* effettuata partendo da un campione fecale positivo per HEV ha confermato la difficoltà oggettiva che si riscontra in questo tipo di esperimento. Infatti, oltre ad essere necessari campioni di partenza con un'elevata carica virale, la presenza di altri virus all'interno dell'inoculo può precludere l'eventuale crescita di HEV. Infatti la maggior parte dei virus, comunemente presenti nel suino (Hirahara et al., 1990, Nilsson et al., 1993), replica efficacemente su diverse linee cellulari. Quindi, gli esperimenti effettuati non hanno portato a una conclusione sull'infettività del virus o sulla sua capacità di crescere *in vitro*, risultando difficile effettuare tale infezione partendo da campioni di campo. Esperimenti simili condotti con sospensioni fecali di suino, riportati in letteratura, sono stati effettuati con campioni negativi per altri virus, perché gli animali provenivano da allevamenti germ-free (comunicazione personale).

Per quanto concerne l'infezione delle cellule con campioni allestiti a partire da salsiccia di fegato, il risultato ottenuto potrebbe indicare la non vitalità del virus presente nell'alimento in esame. Va però tenuto conto che l'esperimento condotto è stato effettuato a partire da una bassa carica virale e che l'infezione è stata condotta con una $MOI < 0,1$ che è invece il valore ottimale (rapporto cellule/virus) per la replicazione di HEV secondo Takahashi et al. (2012).

In conclusione, il risultato ottenuto non può confermare la mancanza di vitalità residua di HEV nella salsiccia di fegato.

Data la rilevazione sempre più frequente di HEV appartenente al genotipo 3 nei prodotti di origine suina destinati al consumo umano, risulta fondamentale l'identificazione di linee cellulari o condizioni colturali che possano supportare in maniera efficace e in tempi minori la crescita di questo virus, anche partendo da campioni a bassa carica virale. Infine, lo sviluppo di un idoneo sistema di replicazione permetterebbe di approfondire le conoscenze sulla patogenesi e l'infettività di HEV che ad oggi si basano solo sui dati legati al genoma virale e su isolati esperimenti condotti con antigeni ricombinanti.

11 Valutazione della presenza del virus dell'epatite E nelle bili di animali al macello

11.1 Introduzione

La bile risulta essere uno dei campioni in cui identificare HEV risulta più semplice (de Deus et al., 2007, Di Bartolo et al., 2010), in quanto sembrerebbe che, in seguito alla replicazione epatica, il virus venga poi escreto anche nella bile (Leblancet al. 2010). Pertanto, al fine di identificare campioni ad elevata carica virale per condurre esperimenti di crescita *in vitro* di SwHEV, si è scelto di campionare le bili da animali al macello. Si è scelta la bile nell'ipotesi che questa oltre a presentare un'eventuale titolo virale più alto, fosse meno soggetta a contaminazione microbica rispetto ai campioni fecali precedentemente usati per le prove di infezione.

Infine, a prescindere dalle prove di coltura di HEV risulta interessante valutare la presenza di HEV in un organo che, a causa di errate pratiche di macellazione, può facilmente andare incontro a rottura con conseguente contaminazione della carcassa. La scelta dell'area geografica dei macelli, il Lazio, nasceva dalla segnalazione di un primo focolaio di HEV di g4, forse legato al consumo di salsicce di fegato crude (Garbuglia et al. 2013).

11.2 Campionamento

Nel 2013, sono state prelevate 70 cistifellee in due macelli del Lazio, uno sito in Provincia di Roma e l'altro in Provincia di Rieti. Gli animali erano macellati a 120 kg (6mesi di età) e provenivano nel primo caso dal Piemonte e dal Veneto mentre nel secondo provenivano da allevamenti dell'Umbria o da privati del Lazio.

11.3 Materiali e Metodi

L'RNA virale è stato estratto da una sospensione al 10% (vol/vol) della bile seguendo il protocollo descritto in precedenza (vedi capitolo 6). Tutti i campioni sono stati analizzati mediante RT-Nested PCR con i primers che amplificano il frammento della regione del capsido (vedi PCR 2 della tabella 6.2). Data la complessità della matrice di partenza i campioni sono stati analizzati sia tal quali che diluiti dieci volte.

In parallelo è stata effettuata una prova di citotossicità della bile mediante saggio MTT Assay (Life Technologies) sulle 3 linee cellulari disponibili (A549, PLC/PCRF/5 e ST100). Le cellule sono state incubate per 1 ora (ovvero lo stesso periodo di tempo utilizzato per l'infezione nell'esperimento precedente, capitolo 10) con diluizioni progressive di bile e con PBS come controllo negativo. L'eventuale attività citotossica viene misurata come riduzione dell'attività enzimatica delle cellule

ovvero come riduzione dell'attività mitocondriale. Infatti il test MTT (MTT indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), è un saggio colorimetrico standard che permette di misurare l'attività enzimatica cellulare, e nello specifico degli enzimi che riducono l'MTT a formazano. L'avvenuta riduzione viene confermata dal viraggio colorimetrico da giallo a blu/violaceo che viene misurata mediante lettura allo spettrofotometro a 570 nm

11.4 Risultati e discussione

Nessuno dei campioni di bile esaminati è risultato positivo per la ricerca del virus HEV. Sebbene siano ancora poco note le dinamiche di infezione da HEV nel suino, diversi studi sostengono che dopo i 3-5 mesi di età ci sia la rimozione dell'infezione da parte del sistema immunitario (Meng et al., 1998a, Meng et al., 1998b). Considerando questo dato alla luce degli esperimenti effettuati in questi 3 anni, si può supporre che una volta infettati, i suini eliminino il virus e che solo occasionalmente si ri-infettino con esso. Ovviamente non avendo nessuna informazione sugli allevamenti di provenienza, non può essere esclusa l'ipotesi che questi animali vengano da allevamenti HEV-free, anche se in base agli studi precedenti questa ipotesi sembra poco probabile.

Per quanto riguarda le prove di citotossicità, solo le cellule poste a contatto con la bile non diluita mostravano una diminuzione dell'attività cellulare mentre già diluendola due volte questo effetto non veniva rilevato (dati non mostrati).

12 Conclusioni

Durante il dottorato di ricerca è stata confermata l'elevata prevalenza di SwHEV negli allevamenti siti in diverse Regioni italiane e le sequenze ottenute hanno mostrato un'elevata identità nucleotidica con i ceppi suini e umani, sia italiani che europei. A differenza di quanto accade nell'uomo, nei suini i ceppi circolanti spesso mostrano una chiara clusterizzazione geografica e, sulla base delle identità nucleotidiche, è possibile identificare i singoli gruppi virali che circolano negli allevamenti.

E' stato inoltre messo in evidenza come SwHEV circolasse già in alcuni allevamenti del Nord Italia nell'anno 2000 e analizzando queste sequenze si è evidenziato come il virus abbia subito poche mutazioni nel corso degli anni, in particolare a livello aminoacidico.

E' stato sequenziato, il primo in Italia, l'intero genoma di uno dei ceppi identificati durante la sorveglianza. Le analisi condotte, dall'allineamento delle sequenze, hanno mostrato la sua vicinanza con ceppi suini ed umani italiani, europei ed extra-europei. L'analisi di porzioni di genoma corrispondenti a geni completi o a domini funzionali (nel caso delle proteine non-strutturali) risulta ad oggi uno dei principali approcci per individuare delle possibili mutazioni che favoriscano il passaggio di SwHEV g3 dal suino all'uomo e che in qualche modo giustifichino la diversa epidemiologia del virus (asintomatico vs epatite cronica vs epidemie)

Per quanto riguarda invece, le prove di crescita *in vitro* di questo virus si è confermata la difficoltà nella replicazione virale, che non è stata ottenuta. Le cause potrebbero essere molteplici, tra cui la necessità di un inoculo con carica virale elevata o la complessità delle matrici di partenza (feci).

Inoltre, è stata confermata l'elevata prevalenza del virus nelle feci di suini in età di macellazione anche se, sulla base dei risultati ottenuti, sembrerebbe che le buone pratiche di macellazione riescano a ridurre in maniera significativa la presenza di SwHEV nei prodotti di origine suina (muscolo, salsicce, salsicce di fegato).

Infine è stato confermato come la via alimentare possa essere implicata nella trasmissione zoonotica di questo virus essendo presente in alimenti come le salsicce di fegato sia fresche che secche. Infatti, sebbene non sia stato possibile replicare il virus su linee cellulari, non è possibile escludere che le porzioni di genoma identificate negli alimenti corrispondano a virus infettivi con un possibile rischio per il consumatore. Questi alimenti sono spesso consumati senza un adeguato trattamento termico e non esistono ancora studi sulla resistenza di HEV all'essiccazione e alla stagionatura.

In conclusione, già dai dati disponibili in letteratura si evince il ruolo emergente del virus HEV e delle infezioni ad esso associate. Si ritiene che vi sia un'ampia sotto-stima dei casi, sebbene ormai appaia chiaro che la malattia può presentarsi anche in forme non acute. Come raccomandato dall'EFSA/ECD sono necessari ulteriori studi per determinare l'importanza della via alimentare nel-

la trasmissione del virus. Inoltre, è raccomandabile una sistematica tipizzazione dei ceppi virali sia umani sia animali per ottenere una migliore comprensione delle fonti di infezione. Sono anche necessari studi per determinare l'importanza di vie di trasmissione di origine alimentare.

Tuttavia ancora molto deve essere fatto nella diagnostica del virus e, come è apparso evidente nei nostri studi, risulta essenziale il miglioramento delle tecniche diagnostiche e in particolare della raccolta di dati quantitativi senza i quali risulta impossibile una valutazione del rischio. Infine, è auspicabile a breve una definitiva messa a punto di sistemi di crescita in vitro che consentiranno di completare i dati di biologia molecolare associandoli a dati sull'infettività del virus.

13 Bibliografia

- Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. 2014 Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve to chronic infections. *J Infect Dis*.
- Acharya SK, Panda SK 2006. Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention. *Trop Gastroenterol*. 27:63-8.
- Aggarwal R, Jameel S. 2011 Hepatitis E. *Hepatology*. 54:2218-26.
- Aggarwal R, Krawczynski K. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 15:9-20.
- Aggarwal R, Naik S. 2009. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol*. 24:1484-93.
- Aggarwal R. 2011. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 26:72-82.
- Ahmad I, Holla RP, Jameel S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*. 161:47-58.
- Arankalle VA, Chadha MS, Chitambar SD, Walimbe AM, Chobe LP, Gandhe SS. 2001. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982-98). *J Viral Hepat* 8:293-303.
- Arankalle VA, Jha J, Favorov MO, Chaudhari A, Fields HA, Banerjee K. 1995 Contribution of HEV and HCV in causing fulminant non-A, non-B hepatitis in western India. *J Viral Hepat*. 2:189-93.
- Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. 2008 Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol*. 74:543-6.
- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP et al. 1983 Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20, 23-31.
- Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, and Dalton H 2004a Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10, 953-5.
- Banks M, Grierson S, Fellows HJ, Stableforth W, Bendall R, Dalton HR. 2007. Transmission of hepatitis E virus. *Vet Rec* 160:202.
- Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R et al. 2004c Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Veterinary Record* 154, 223-7.
- Barnaud E, Rogee S, Garry P, Rose N, and Pavio N 2012 Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* 78, 5153-9.
- Batts W, Yun S, Hedrick R, and Winton J 2011 A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* 158, 116-23.

- Baylis SA, Blümel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nübling CM, et al. 2013 HEV Collaborative Study Group. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis.* 19:729-35.
- Berke T, Matson DO. 2000. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145:1421-36.
- Berto A, Backer JA, Mesquita JR, Nascimento MS, Banks M, Martelli F, Ostanello F, Angeloni G, Di Bartolo I, Ruggeri FM, et al. 2012 Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes.* 5:190.
- Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R, Martelli F, John R, Reetz J, Ulrich RG, et al. 2013 Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis.* 19:264-6.
- Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. 2012 Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2012 8:1358-60.
- Berto A, Van der Poel WH, Hakze-van der Honing R, Martelli F, La Ragione RM, et al. 2013 Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *J Virol Methods.* 2013 2:327-32
- Bile K, Isse A, Mohamud O, Allebeck P, Nilsson L, Norder H, Mushahwar IK, Magnus LO. 1994 Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Trop Med Hyg.* 5:466-74.
- Boadella M, Ruiz-Fons JF, Vicente J, Martin M, Segales J, and Gortazar C 2012 Seroprevalence evolution of selected pathogens in iberian wild boar. *Transbound Emerg Dis* 59, 395-404.
- Boccia D, Guthmann JP, Klovstad H, Hamid N, Tatay M, Ciglenecki I, Nizou JY, Nicand E, Guerin PJ. 2006 High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis.* 42:1679-84.
- Bouamra Y, Gérolami R, Arzouni JP, Grimaud JC, Lafforgue P, Nelli M, Tivoli N, Ferretti A, et al. 2014 Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. *Intervirology.* 57:43-8.
- Bouamra Y, Gérolami R, Arzouni JP, Grimaud JC, Lafforgue P, Nelli M, Tivoli N, Ferretti A, et al. 2014 Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. *Intervirology.* 7:43-8
- Bouquet J, Cheval J, Rogee S, Pavio N, and Eloit M 2012b Identical consensus sequence and conserved genomic polymorphism of hepatitis E virus during controlled interspecies transmission. *J Virol* 86, 6238-45.
- Bouwknegt M, Frankena K, Rutjes SA, Wellenberg GJ, de Roda Husman AM, van der Poel WH, de Jong MC. 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res.* 39:40.
- Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, Rutjes SA, de Roda Husman AM. 2007. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot.* 70:2889-95.

- Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MC et al. 2009 The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5, 7.
- Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S et al. 2006 Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* 16, 79-83.
- Buti M, Clemente-Casares P, Jardi R, Formiga-Cruz M, Schaper M, Valdes A, Rodriguez-Frias F, Esteban R, Girones R. 2004. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol*. 41:126-31.
- Cacopardo B, Russo R, Preiser W, Benanti F, Brancati G, Nunnari A. 1997. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* 25:313-6.
- Caprioli A, Martelli F, Ostanello F, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Del Chiaro L, Tolari F. 2007. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet Rec* 161:422-3.
- Caron M, Enouf V, Than SC, Dellamonica L, Buisson Y, Nicand E. 2006. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 44:3440-2.
- Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boue F et al. 2012 High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol* 50, 2888-93.
- Casas M, Pina S, de Deus N, Peralta B, Martín M, Segalés J. 2009. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. *Vet Microbiol*. 138:78-84.
- Chandler JD, Riddell MA, Li F, Love RJ, Anderson DA. 1999. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol*. 68:95-105.
- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*. 33:451-64.
- Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, Li L, Wang X, Zhuang H. 2009 Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res*. 39:1153-8.
- Choi C and Chae C (2003) Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* 38, 827-32.
- Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S et al. 1995 Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 53, 228-32.
- Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 9:448-54
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*. 202:825-34.

- Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, and Tamalet C 2007 Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 13, 648-9.
- Colson P, Romanet P, Moal V, Borentain P, Purgus R, Benezech A, Motte A, et al. 2012 Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg Infect Dis*. 18:1361-4
- Cui A, Xu C, Tan X, Zhang Y, Zhu Z, Mao N, Lu Y, Xu W. 2013 The development and application of the two real-time RT-PCR assays to detect the pathogen of HFMD. *PLoS One*. 8:61451.
- Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R, Banks M, Ijaz S, Teo CG, Levine DF. 2007. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 14:304-9.
- de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarias M, Pina S, Martin M et al. 2008a Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 132, 19-28.
- de Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D et al. 2008b Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* 129, 163-70.
- de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 119:105-14.
- Deepak B, Gurdeep SD, Harmesh SB 2009 Coinfection of Hepatitis A and E with Salmonella Infection; a Case Report Iran J Pediatr 19:79-81
- Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, 2012 E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*. 8:1282-9.
- Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. 2008. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 132:47-55.
- Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, and Ruggeri FM 2011 Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* 149, 330-8.
- Di Martino B, Di Profio F, Martella V, Di Felice E, Di Francesco CE, Ceci C, Marsilio F. 2010. Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Arch Virol*. 155:103-6.
- Diez-Valcarce M, Kovac K, Cook N, Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M. 2011 Construction and analytical application of internal amplification controls (IAC) for detection of foodborne viruses by (RT) real-time PCR. *Food Analytical Methods*. 4:437-45.
- Dremsek P, Wenzel JJ, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH et al. 2012 Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med Microbiol Immunol* 201, 189-200.

Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R et al. 2012 Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* 86, 9134-47.

Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, et al. 2010 Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis*. 2010 51:e24-7.

Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Mendez E, Yeager M. 2012 Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *J Mol Biol*. 5:650-8.

Dufkova L, Scigalkova I, Moutelikova R, Malenovska H, Prodelalova J 2013 Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an emerging new sapovirus GIII genotype. *Arch Virol* 158:549-558

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2011 Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 9:2190.

Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S et al. 2004 Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol* 98, 159-63.

Emerson S U, Nguyen H, Graff J, Stephany D A, Brockington A, Purcell R H. 2004. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 78: 4838–4846.

Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, and Purcell RH 2002 Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40, 4576-80.

Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. 1999 Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J Virol Methods*. 81:109-13

Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, Childs JE, Margolis HS. 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis*. 181:449-55.

Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. 2007 Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*. 88:912–7

Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. 2008 Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol*. 123:32-7

Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Gómez-Muñoz MT, Vega S, et al. 2007 Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res*. 71:236-40

- Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Vega S, Gómez MT, Pérez-Gracia MT. 2006 Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 18:462-5.
- Fix AD, Abdel-Hamid M, Purcell RH, Shehata MH, Abdel-Aziz F, Mikhail N, el Sebai H, et al. 2000. Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg* 62:519-23
- Fogeda M, de Ory F, Avellón A, Echevarría JM. 2009 Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol.* 45:259-61.
- Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, Boncz A, Zentai J, Szucs G, Reuter G, Bakonyi T. 2010 Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet Microbiol.* 143:106-16.
- Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, Gómez MT, Pérez-Gracia MT. 2008 Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg.* 78:1012-5.
- Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni CM, Sordillo P, Gentile D, La Scala P et al., 2013. Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg Infect Dis.* 19:110-4.
- Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, Anderson DA, Benard HJ, Schroeder BA et al. 2001. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 65:525-9.
- Geng JB, Fu HW, Wang L, Wang XJ, Guan J, Chang YB, Li LJ, Zhu YH, Zhuang H, Liu QH, Peng XC. 2010. Hepatitis E virus (HEV) genotype and the prevalence of anti-HEV in 8 species of animals in the suburbs of Beijing. *J. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 31:47-50.
- Gessoni G and Manoni F 1996 Hepatitis E virus infection in north-east Italy: serological study in the open population and groups at risk. *J Viral Hepat* 3, 197-202.
- Goens SD, Perdue ML. 2004. Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim Health Res Rev.* 5:145-56.
- Grandadam, M, Tebbal S, Caron M, Siriwardana M, Larouze B, et al. 2004. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 85:3189-94.
- Guillaume V, Lefeuvre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R, Lam SK, Wild TF, Deubel V. 2004 Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods.* 120:229-37.
- Guo H, Zhou EM, Sun ZF, Meng XJ, Halbur PG. 2006. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol.* 87:217-23.
- Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belák S, Widén F. 2007 Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods.* 146:226-35.
- Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH. 2011. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 6:e22673.

Halac U, Béland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, Houde A, Alvarez F. Chronic hepatitis 2012 E infection in children with liver transplantation. *Gut*. 61:597-603.

Halaihel N, Masia RM, Fernandez-Jimenez M, Ribes JM, Montava R, De Blas I, Girones O et al. 2010 Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol Infect* 138:542-548

Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, and Meng XJ 2001 Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 82, 2449-62.

He J, Innis BL, Shrestha MP, Clayson ET, Scott RM, Linthicum KJ, Musser GG, Gigliotti SC, Binn LN et al. 2006. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol*. 44:1208.

Hewitt J, Greening GE. 2006 Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. *J Food Prot*. 69:2217-23.

Hirahara T, Yasuhara H, Matsui O, Fukuyama S, Yamanaka M, Izumida A, Yoshiki K, Kodama K, et al. 1990 Growth activity of porcine adenoviruses in primary porcine testicular cell cultures. *Nihon Juigaku Zasshi*. 525:1089-91.

Hosmillo M, Jeong YJ, Kim HJ, Park JG, Nayak MK, Alfajaro MM et al. 2010 Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows. *Arch Virol* 155, 1157-61.

Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, Liaw YF. 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*. 37:3828-34.

Hu GD, Ma X. 2010. Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region. *Bing Du Xue Bao* 26:27-32.

Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, et al. 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*. 40:1326-32.

Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW et al. 2004 Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85, 1609-18.

Hundes A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, et al. 2009 Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods*. 158:130–5.

Hundes A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R. 2006 Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*. 72:7886–93.

- Hyams C, Mabayoje DA, Copping R, Maranao D, Patel M, Labbett W, Haque T, Webster DP. 2014 Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol*. 86:478-83.
- Hyams KC, McCarthy MC, Kaur M, Purdy MA, Bradley DW, Mansour MM, Gray S, Watts DM et al. 1992 Acute sporadic hepatitis E in children living in Cairo, Egypt. *J Med Virol*. 37:274-7.
- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF et al. 2005 Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis*. 192:1166-72.
- Ijaz S, Said B, Boxall E, Smit E, Morgan D, Tedder RS. 2013 Indigenous Hepatitis E in England and Wales From 2003 to 2012: Evidence of an Emerging Novel Phylotype of Viruses. *J Infect Dis*.
- Jebblaoui A, Haim-Boukoba S, Marchadier E, Mokhtari C, Roque-Afonso AM. 2013 Genotype 4 hepatitis e virus in france: an autochthonous infection with a more severe presentation. *Clin Infect Dis*.57:122-6.
- Johne R, Plenge-Bonig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, and Schielke A (2010) Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 91, 750-8.
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, and Hill VR 2006 A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65-71.
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. 2006 A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 131:65–71
- Jung K, Kang B, Song DS, Chae C. 2007. Prevalence and genotyping of hepatitis E virus in swine population in Korea between 1995 and 2004: a retrospective study. *Vet J* 173:683-7.
- Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, Miller KD, Davey RT, Emerson SU. 2001 Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J Gen Virol*. 82:1687-93
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J et al. 2012 Hepatitis E. *Lancet* 379, 2477-88.
- Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M et al. 2012. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res Notes*. 5:4.
- Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM, Maynard JE, Cook EH, Mishra RP et al. 1984 Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 252, 3140-5.
- Kantala T, Maunula L, von Bonsdorff CH, Peltomaa J, Lappalainen M. 2009 Hepatitis E virus in patients with unexplained hepatitis in Finland. *J Clin Virol*. 45:109-13.
- Karpe YA and Lole KS 2010 RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol* 84, 9637-41.

- Kase JA, Correa MT, Luna C, and Sobsey MD 2008 Isolation, detection and characterization of swine hepatitis E virus from herds in Costa Rica. *Int J Environ Health Res* 18, 165-76.
- Kase JA, Correa MT, Sobsey MD. 2009 Detection and molecular characterization of swine hepatitis E virus in North Carolina swine herds and their faecal wastes. *J Water Health*. 7:344-57.
- Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, and Halbur PG 2004 Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 42, 5047-52.
- Khudyakov Y and Kamili S 2011 Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 161, 84-92.
- Khuroo MS, Kamili S, and Khuroo MS 2009 Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat* 16, 519-23.
- Khuroo MS, Kamili S, and Yattoo GN 2004 Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 19, 778-84.
- Kim HJ, Cho HS, Cho KO, Park NY 2006 Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:155-159.
- Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Bouwknecht M, Rutjes S, Willems K, Moloney R, de Roda Husman AM et al. 2012 Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol*. 4:179-91.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.
- Kuno A, Ido K, Isoda N, Satoh Y, Ono K, Satoh S, Inamori H, Sugano K, Kanai N, Nishizawa T, Okamoto H. 2003. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatol Res*. 26:237-242.
- La Rosa G, Muscillo M, Vennarucci VS, Garbuglia AR, La Scala P, Capobianchi MR. 2011 Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *J Gen Virol*. 92:1617-26
- La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Vennarucci VS, Muscillo M. 2010 Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl Environ Microbiol*. 76:5870-3
- Lack JB, Volk K, and Van Den Bussche RA 2012 Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg Infect Dis* 18, 1268-73.
- Leblanc D, Poitras E, Gagné MJ, Ward P, Houde A. 2010 Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol*. 139:206-9
- Leblanc D, Ward P, Gagné MJ, Poitras E, Müller P, Trottier YL, Simard C, Houde A. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol*. 117:160-6.

- Lee YH, Ha Y, Ahn KK, and Chae C 2009a Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Veterinary Journal* 179, 417-21.
- Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. 2010 Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.*138:145-66
- Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J et al. 2013 Characterization of full genome of rat hepatitis e virus strain from Vietnam. *Emerg Infect Dis* 19, 115-8.
- Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y et al. 2005b Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11, 1958-60.
- Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. 2005b. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.* 11:1958-60.
- Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N. 2006. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg.* 74:932-6.
- Lu L, Li C, and Hagedorn CH 2006 Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16, 5-36.
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R. 2004 Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.*70:1448-54.
- Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V et al. 2011 Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 17, 2309-12.
- Mao J, Zhao Y, She R, Xiao P, Tian J, Chen J. 2013 One case of swine hepatitis E virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection in weaned pigs. *Virol J.* 10:341.
- Martelli F, Caprioli A, Di Bartolo I, Cibir V, Pezzotti G, Ruggeri FM, Ostanello F. 2006 Detection of swine torque teno virus in Italian pig herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 5:234-8
- Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, Marata A, Fiegna C, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Delogu M, Ostanello F. 2008. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol.* 126:74-81.
- Martelli F, Toma S, Di Bartolo I, Caprioli A, Ruggeri FM, Lelli D, Bonci M, Ostanello F. 2010. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res Vet Sci.* 88:492-6.
- Martín M, Segalés J, Huang FF, Guenette DK, Mateu E, de Deus N, Meng XJ. 2007 Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol.* 122:16-24
- Martinelli N, Pavoni E, Filogari D, Ferrari N, Chiari M, Canelli E, Lombardi G. Hepatitis E Virus in Wild Boar in the Central Northern Part of Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2013

- Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S. 2014 Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *Int J Food Microbiol.*17:1-8
- Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S. 2012 Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int J Food Microbiol.* 157:167-73
- Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S. 2005. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol Res.* 31:178-83.
- Matsuda HK, Okada K., Takahashi K, S Mishiro. 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188:944.
- Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M et al. 2007 Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152, 1375-81.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA et al. 2008 Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204-3219.
- Meng XJ, Anderson DA, Arankalle VA, Emerson SU, Harrison TJ, Jameel S et al. 2012 Hepeviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Academic Press L, UK. (ed.), Vol. pp. 1021-8.
- Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, Purcell RH, Emerson SU. 1998a. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol.* 143:1405-15.
- Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. 1998b. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 72:9714-21.
- Meng XJ, Shivaprasad HL, Payne C. 2008 Hepatitis E virus infections. In *Diseases of Poultry*. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE(ed.), 12th edition. (ed.), Vol. pp. 443–52.
- Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40:117-22.
- Meng XJ. 2011. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161:23-30.
- Meng, XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9860-5.

- Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, Inoue G, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Abe N, Mishiro S. 2007. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res.* 37:214-20.
- Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, et al. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol.* 40:3209-18
- Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukoba S, Jebbaoui A, Tessé S, Savary J, et al., 2013 Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol.* 58:36-40
- Mor SK, Chander Y, Marthaler D, Patnayak DP, Goyal SM. 2012 Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. *J Vet Diagn Invest.* 24:1064-7.
- Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. 1992. A large waterborn virale hepatitis E virus epidemic in Kanpur, India. *Bull WHO* 70: 597-604.
- Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res.* 34:137-40.
- Navidad PD, Li H, Mankertz A, Meehan B. 2008 Rolling-circle amplification for the detection of active porcine circovirus type 2 DNA replication in vitro. *J Virol Methods.* 152:112-6.
- Neuvonen M and Ahola T 2009 Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J Mol Biol* 385, 212-25
- Nilsson M, von Bonsdorff CH, Svensson L. 1993 Biosynthesis and morphogenesis of group C rotavirus in swine testicular cells. *Arch Virol.* 133:21-37.
- Ning H, Yu S, Zhu Y, Dong S, Yu R, Shen S, Niu Z, Li Z. 2008. Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs. *Vet Microbiol.* 126:257-63.
- Nishizawa T, Takahashi M, Mizuo H, Miyajima H, Gotanda Y, Okamoto H. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84:1245-51.
- Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H et al. 2005. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol.* 86:3321-6.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:929-36.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Usui R, Kobayashi E. 2004. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 32:57-

- Okamoto H. 2008. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127: 216-218.
- Okamoto H. 2011 Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* 161, 65-77.
- Okamoto H. 2013 Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol.* 4:147-58.
- Okano H, Takahashi M, Isono Y, Tanaka H, Nakano T, Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S, et al. 2013 Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol Res.*
- Oliveira-Filho EF, König M, Thiel HJ. 2013 Genetic variability of HEV isolates: inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol.* 165:148-54.
- Panda SK, Thakral D, and Rehman S 2007 Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17, 151-80.
- Park JH, Han JH, Kwon HM. 2008 Sequence analysis of the ORF 7 region of transmissible gastroenteritis viruses isolated in Korea. *Virus Genes.* 36:71-8.
- Pavio N, Meng XJ, and Renou C 2010 Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41, 46.
- Payne CJ, Ellis TM, Plant SL, Gregory AR, Wilcox GE. 1999. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol.* 68:119-25.
- Pei Y, Yoo D. 2002. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 40:4021-9.
- Peralta B, Biarnes M, Ordonez G, Porta R, Martin M, Mateu E et al. 2009a Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol* 137, 31-6.
- Peralta B, Casas M, de Deus N, Martin M, Ortuno A, Perez-Martin E et al. 2009b Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol* 137, 66-73.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F et al. 2006 RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001.
- Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, and Girones R 2000 HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 33, 826-33.
- Preiss JC, Plentz A, Engelmann E, Schneider T, Jilg W, Zeitz M, Duchmann R. 2006 Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection.* 34:173-5.
- Purcell RH and Emerson SU 2010 Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Dis* 202, 819-21.
- Purcell RH, Emerson SU. 2001 Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 42:161-77.

- Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S et al. 2011 Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 2216-22.
- Raj VS, Smits SL, Pas SD, Provacia LB, Moorman-Roest H, Osterhaus AD et al. 2012 Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18, 1369-70.
- Razonable RR 2011a Rare, unusual, and less common virus infections after organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 16, 580-7.
- Razonable RR, Findlay JY, O'Riordan A, Burroughs SG, Ghobrial RM, Agarwal B et al. 2011b Critical care issues in patients after liver transplantation. *Liver Transpl* 17, 511-27.
- Rehman S, Kapur N, Durgapal H, and Panda SK 2008 Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370, 77-92.
- Renou C, Moreau X, Pariente A, Cadranel JF, Maringe E, Morin T, Causse X, Payen JL, Izopet J et al. 2008. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment Pharmacol Ther.* 27:1086-93.
- Reuter G, Boldizsar A, Kiss I, Pankovics P 2008 Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts. *Emerg Infect Dis* 14:1968-1970
- Reuter G, Boldizsár A, Pankovics P. 2009 Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Arch Virol.* 154:101-8.
- Reuter G, Fodor D, Forgách P, Kátai A, Szucs G. 2009. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in Hungary: endemic, food-borne zoonosis. *Orv Hetil.* 150:415-21.
- Rodríguez-Frias F, Jardi R, Buti M. 2012. Hepatitis E: Molecular virology, epidemiology and pathogenesis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* in press.
- Rogée S, Talbot N, Caperna T, Bouquet J, Barnaud E, Pavio N. 2013 New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol.* 94:549-58.
- Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR. 2011. Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol.* 54:34-40.
- Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR. 2011 Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol.* 54:34-40
- Ropp SL, Tam AW, Beames B, Purdy M, Frey TK. 2000 Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch Virol.* 7:1321-37.
- Rozanov MN, Koonin EV, and Gorbalenya AE 1992 Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 73: 2129-34.

- Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknecht M, de Roda Husman AM. 2007 Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods*. 143:112-6.
- Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, Vennema H, Duizer E et al. 2009 Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 15, 381-7.
- Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknecht M et al. 2010 Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J Virol Methods* 168, 197-206.
- Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, Younan M, Mohamed AH. 2007. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol*. 7:368-73.
- Schielke A, Sachs K, Lierz M, Appel B, Jansen A, and Johne R 2009 Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J* 6, 58.
- Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 57:243-51.
- Schlauder GG, Mushahwar IK. 2001 Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*. 65:282-92.
- Scobie L and Dalton HR 2013 Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Viral Hepat* 20, 1-11.
- Scotto G, Martinelli D, Centra M, Querques M, Vittorio F, Delli Carri P, Tartaglia A, et al. 2014 Epidemiological and clinical features of HEV infection: a survey in the district of Foggia (Apulia, Southern Italy). *Epidemiol Infect*. 142:287-94.
- Scotto G, Martinelli D, Giammarino A, Prato R, and Fazio V 2013 Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in immigrants: a seroepidemiological survey in the district of Foggia (Apulia-southern Italy). *J Med Virol* 85, 261-5.
- Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martin M. 2008. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J*. 175:130-2.
- Shukla P, Chauhan UK, Naik S, Anderson D, Aggarwal R. 2007. Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *J Viral Hepat* 14:310-7.
- Smith DB, Purdy MA, Simmonds P. 2013 Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol*. 87:4161-9.
- Song YJ, Jeong HJ, Kim YJ, Lee SW, Lee JB, Park SY, Song CS, Park HM, Choi IS. 2010. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol*. 82:583-91.

- Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 2004. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol.* 42:5371-4.
- Sun ZF, Larsen CT, Huang FF, Billam P, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. 2004. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol.* 42:2658-62.
- Tahan V, Ozdogan O, Tozun N. 2003. Epidemiology of viral hepatitis in the Mediterranean basin. *Rocz Akad Med Bialymst* 48:11-7.
- Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330:501-5.
- Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T et al. 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol.* 43:49-56.
- Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F et al. 2003 Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84, 851-62.
- Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S et al. 2011 Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92, 902-8.
- Tamada Y, Yano K, Yatsuhashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. 2004. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40:869-70.
- Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88: 903–911.
- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371-3.
- Teo CG. 2006. Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr Opin Infect Dis* 19:460-6.
- Teshale EH, Howard CM, Grytdal SP, Handzel TR, Barry V, Kamili S, Drobeniuc J, Okware S, Downing R, Tappero JW, Bakamutumaho B, Teo CG, Ward JW, Holmberg SD, Hu DJ. 2010. Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg Infect Dis.* 16:126-9.
- Thomas DL, Yarbough PO, Vlahov D, Tsarev SA, Nelson KE, Saah AJ et al. 1997 Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol* 35, 1244-7.

- Tomiyama D, Inoue E, Osawa Y, and Okazaki K 2009 Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis*, in Hokkaido, Japan. *J Viral Hepat* 16, 524-8.
- van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M et al. 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7:970-6.
- Vasickova P, Psikal I, Widen F, Smitalova R, Bendova J, Pavlik I, Kralik P. 2009. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Sci.* 87:143-8.
- Vital CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:117-22.
- Vulcano A, Angelucci M, Candelori E, Martini V, Patti AM, Mancini C, Santi AL, Calvani A, Casagni L et al. 2007 HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann Ig.* 19:181-6
- Wang L and Zhuang H 2004 Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol* 10, 2157-62.
- Wang Y and Ma X 2010) Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50, 937-41.
- Wang YC, Zhang HY, Xia NS, Peng G, Lan HY, Zhuang H, Zhu YH, Li SW, Tian KG, Gu WJ et al. 2002. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol.* 67:516-21.
- Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, and Jilg W 2011 Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol* 52, 50-4.
- Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A et al. 2008 Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 198, 1732-41.
- Widen F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, Metreveli G, Belak S, Hallgren G et al. 2011 Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol Infect* 139, 361-71.
- Williams TPE, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE et al. 2001 Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39, 3040-6.
- Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S et al. 2009 ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90, 1880-91.
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84:2351-7.

- Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, Friendship RM, Yoon Y, Gottschalk M et al. 2001. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8:1213-9.
- Yu C, Zimmerman C, Stone R, Engle RE, Elkins W, Nardone GA, Emerson SU, Zanetti AR., Dawson GJ. 1994. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J Med Virol* 42:318-20.
- Zanetti AR and Dawson GJ 1994 Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J Med Virol* 42, 318-20.
- Zanetti, AR, Schlauder GG, Romanò L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ, Mushahwar IK. 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57:356-60.
- Zhai L, Dai X, Meng J. 2006 Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Res*.120(1-2):57-69
- Zhang CF, Song CP, Chen CM, Cui SJ, Miao LF. 2010 Reproductive failure in wild boars associated to porcine parvovirus infection and in vivo and in vitro characterization of the causal isolate. *Trop Anim Health Prod*. 42:1611-3.
- Zhang W, Shen Q, Mou J, Yang ZB, Yuan CL, Cui L, Zhu JG, Hua XG, Xu CM, Hu J. 2008. Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds. *Epidemiol Infect*. 136:1020-6.
- Zhang Y, Tan X, Cui A, Mao N, Xu S, Zhu Z, Zhou J, Shi J, Zhao Y, Wang X, Huang X, Zhu S et al. 2013 Complete genome analysis of the C4 subgenotype strains of enterovirus 71: predominant recombination C4 viruses persistently circulating in China for 14 years. *PLoS One*. 8:e56341.
- Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z et al. 2009 A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 81, 1371-9.
- Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, Xia N, Jiang Q. 2006. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis*. 193:1643-9.
- Zhou EM, Guo H, Huang FF, Sun ZF, Meng XJ. 2008. Identification of two neutralization epitopes on the capsid protein of avian hepatitis E virus. *J Gen Virol*. 89:500-8.
- Zhuang H, Cao XY, Liu CB, Wang GM. 1991. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in China. *Viral Hepatitis C, D and E*. Amsterdam: Excerpta Medica: 277-285.

Ringraziamenti

Volevo ringraziare il Prof. Fabio Ostanello per il supporto continuo che mi ha dato durante tutti questi anni; la dott.ssa Ilaria Di Bartolo per la pazienza e la costanza nell'insegnamento della biologia e delle biotecnologie ad un veterinario ... e chissà forse sono riuscita a diventare almeno un po' un VET-B...; il dott. Franco M. Ruggeri per avermi permesso di effettuare questo meraviglioso percorso formativo; Eleonora e Silvia le mie supercompagne di dottorato ... davvero non saprei da dove iniziare; Marina, la Guenda, Giovanni, Roberto, Antonio ... e tutta la palazzina 21 dell'Istituto Superiore di Sanità ... perché ... se quando arrivi al "lavoro" ti spunta il sorriso grazie alle persone che hai intorno, non ti rimane davvero che ringraziarle di cuore per tutto quello che ti hanno dato.

Inoltre volevo ringraziare la dott.ssa Chiara Marigistrali dell'IZSUM, il dott. Raffaele Marrone della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", la dott.ssa Annalisa Guercio dell'IZS di Palermo per la collaborazione e per avermi fornito i campioni da utilizzare per questa tesi.